Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. K. Zipf

ÜBER EINEN DESOXYRIBONUCLEASE I-INHIBITOR DES HÜHNEREMBRYOS.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität München

Brigitte Schneider

Starnberg 1967

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. K. Zipf

ÜBER EINEN DESOXYRIBONUCLEASE I-INHIBITOR DES HÜHNEREMBRYOS.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität München

Brigitte Schneider

Starnberg 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät

der Universität München

Dekan : Prof. Dr. A. Herrlich
Referent : Prof. Dr. Dr. h.c. K. Zipf

Tag der Promotion: 27.2.1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Problemstellung	1
2.	Zur Einführung	
2.1.	Struktur und Biosynthese der Desoxyribonucleinsäure (DNA)	2
2.2.	Zur Enzymologie und biologischen Bedeutung der DNasen	3
2.3.	Inhibitoren der DNase I	4
2.3.1.	Künstliche Inhibitoren	4
2.3.2.	Natürliche Inhibitoren	4
3.	Methodik	7
3.1.	Tiermaterial	7
3.2.	Behandlung, Aufarbeitung und Aufbewahrung des Tiermaterials	7
3.3.	Gleichzeitige Bestimmung von DNase I- und Inhibitoraktivität	8
3.3.1.	Prinzip	8
3.3.2.	Reagentien	8
3.3.3.	Lösungen	9
3.3.4.	Ausführung	10
3.4.	Bestimmung der Proteinkonzentration	11
3.4.1.	Prinzip	11
3.4.2.	Reagentien	12
3.4.3.	Lösungen	12
3.4.4.	Ausführung	12
3.4.5.	Berechnung des Proteingehaltes	12
3.5.	Berechnung der mittleren Schwankung	13
4.	Ergebnisse	14
4.1.	Reaktionsablauf des DNA-Abbaues an ungehemmter DNase I	14
4.1.1.	Enzymkonzentration	14
4.1.2.	Standardisierung	14
4.1.3.	Stetigkeit der Reaktionen	15

Seite

4.2. Nachweis des Inhibitors 15

4.2.1. Rattenleber 15

4.2.2. Hühnerembryo 15

4.2.3. Zwei subcelluläre Inhibitorfraktionen im Hühnerembryo 16

4.3. Inhibitoraktivität in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration 16

4.4. Eigenschaften des Inhibitors 17

4.4.1. Temperaturempfindlichkeit 17

4.4.2. Nachweis von Sulfhydryl-Gruppen .. 19

4.5. Zur Wirkungsweise von Enzym und Inhibitor 19

4.5.1. Kinetik des DNA-Abbaues an DNase I in Gegenwart des Inhibitors 19

4.5.2. Abhängigkeit der Inhibitoraktivität von Enzymaktivität und Reaktionszeit 2o

4.6. Hemmtyp 21

4.7. Zum Verhalten des DNase I-Inhibitors des Hühnerembryos während der Ontogenese ... 23

4.7.1. Inhibitoraktivität, bezogen auf die Gewichtseinheit Frischgewicht. 23

4.7.2. Inhibitoraktivität, bezogen auf die Gewichtseinheit Protein 25

4.7.3. Inhibitoraktivität, bezogen auf den Gesamtembryo 28

4.8. Verhältnis der Inhibitoraktivitäten von "Z"- und "KZ"-Überstand für die DNase I-Inhibitoraktivität 28

4.9. Verteilung des Inhibitors auf einzelne Organe 3o

4.1o. Ontogenese des Inhibitors in der Allantoisflüssigkeit 32

Seite

5. Diskussion 33

5.1. Nachweis des Inhibitors im Hühnerembryo 33

5.2. Proportionalität zwischen Hemmeffekt und Inhibitormenge 33

5.3. Nachweis zweier Inhibitorfunktionen .. 33

5.4. Abhängigkeit der Inhibitoraktivität von der Enzymaktivität 33

5.5. Zum Verhalten der Inhibitoraktivität bei Lagerung in der Kühltruhe 35

5.6. Zur anfänglichen Verzögerung der Enzymreaktion bei Zugabe des Inhibitors 36

5.7. Zu den chemisch-physikalischen Eigenschaften des Inhibitors 36

5.8. Zum Verhalten des DNase I-Inhibitors im Hühnerembryo während der Ontogenese 36

5.9. Zur Verteilung des Inhibitors in den Organen 38

6. Zusammenfassung 39

7. Literaturverzeichnis 41

Lebenslauf

1. Problemstellung

Desoxyribonucleasen (DNasen) sind im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet. Ihre biologische Bedeutung konnte bislang nur teilweise geklärt werden.

Der Nachweis von DNase I-Aktivität wird in einzelnen Geweben fast stets durch spezifische DNase I-Inhibitoren erschwert. Von einer Aufklärung der biologischen Bedeutung der Inhibitoren und ihrer Beziehungen zur DNase I werden daher Analogschlüsse auf die Aufgabe des Enzyms im Stoffwechsel eines Organismus erwartet.

Neueren Untersuchungen zufolge (3, 11, 12, 35, 36,44, 1, 61, 64, 65, 66, 68, 71, 74, 75) spielen DNasen auch eine wesentliche Rolle bei der Nucleinsäuresynthese und Zellteilung. Die Beantwortung der Frage nach der biologischen Bedeutung von DNasen für den Zellteilungsstoffwechsel ist somit vor allem von Untersuchungen der Enzyme in Geweben mit intensivem Teilungsstoffwechsel zu erwarten. Dies trifft vor allem auch für Gewebe während der O n t o g e n e s e zu. Da die Ontogenese der DNasen des G e s a m t - H ü h n e r e m b r y o s bekannt ist (10, 19, 38, 71), sollte untersucht werden, ob auch aus dem Verhalten eines natürlichen embryonalen Inhibitors der DNase I Schlüsse auf die Bedeutung des Enzyms für die Embryonalentwicklung des Huhns gezogen werden können.

Von besonderem Interesse war dabei die Beantwortung der Frage, ob Inhibitor und Enzym gleichzeitig auftreten, und wie sich Enzym (38, 71), Inhibitor (vorliegende Untersuchung), Substrat (38, 56, 59, 63, 71, 72) und Substratumsatz (27, 52, 69) während der Ontogenese des Hühnerembryos verhalten.

2. Zur Einführung

2.1. Struktur und Biosynthese der Desoxyribonucleinsäure (DNA)(32)

In den letzten Jahren gelangen der Forschung wesentliche Einblicke in die chemische Struktur des Genapparates der Zelle. Die DNA wurde als molekulare Grundlage des genetischen Materials erkannt. Ihre Bausteine sind die Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin, der Zucker Desoxyribose und Phosphorsäure. Die Purin- bzw. Pyrimidin-Basen sind glykosidisch mit dem C-Atom 1 der Desoxyribose zum Nucleosid verknüpft. Die Nucleoside sind mit der Phosphorsäure durch Esterbindung zu den Mononucleotiden verbunden. Diese sind über Phosphordiesterbrücken zu langen Polynucleotidsträngen kondensiert.

Das vollständige DNA-Molekül besteht aus zwei komplementären Strängen, die als Doppelhelix vorliegen. Dabei zeigen die Basen der Stränge zur Helixachse. Jede Base des einen Stranges bestimmt - aus sterischen Gründen - den gegenüberliegenden Paarling des anderen und ist mit ihm über Wasserstoffbrücken gekoppelt. Es verknüpfen sich so immer Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin. Die Basensequenz innerhalb eines Stranges bestimmt ihre genetische Information. Diese wird beim Vorgang der Transkription von der mRNA ("messenger-RNA" oder "Boten-RNA") abgegriffen, deren Nucleotidsequenz die Reihenfolge der in den Ribosomen zu Proteinen verknüpften Aminosäuren bestimmt.

Zum anderen ist jeder einzelne DNA-Strang der Doppelhelix Matrize für einen neuen Strang und gewährleistet so identische Reduplikation und damit Erbkonstanz.

Die Synthese der DNA kann in vitro mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase (DNA-Nucleotidyltransferase, E.C.2.7.7.7.) nachgeahmt werden (32). In geeignetem Reaktionsmilieu müssen dazu die Triphosphate aller vier Nucleoside und eine als Matrize dienende "Starter"- oder "primer"-DNA vorhanden sein (65, 66). Die DNA-Synthese i n v i v o vollzieht sich analog (32).

2.2. Zur Enzymologie und biologischen Bedeutung der DNasen

Beim Abbau der DNA sind die DNasen I und II beteiligt (44, 67, 62). Über ihre Wirkungsweise beim Aufbau ist bisher noch wenig bekannt. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die DNase II in hohen Konzentrationen vor allem in Geweben mit großer Zellteilungsrate und intensivem DNA-Stoffwechsel vorkommt (3, 44, 61, 67, 15). Bei biologisch einfacheren Lebewesen, wie Seeigeleiern, Eiern von Turbellarien und Fröschen, Hefen, Micrococcen, Euglena gracilis, Glaucoma pyriformis und menschlichen Gewebekulturen wurde die Zellteilungsgeschwindigkeit durch Zusatz von DNase I in Konzentrationen von 10^{-8} - 10^{-5} g/ml um den Faktor 2 - 3 (35, 36, 74, 75) erhöht. Einige Stunden vor Beginn der DNA-Synthese nach Teilhepatektomie von Ratten war die Aktivität der DNase II signifikant erhöht (1, 12, 44, 61, 74). DNasen-Konzentrationen in der Größenordnung von 10^{-8} - 10^{-4} g/ml beschleunigten i n v i t r o die DNA-Synthese an DNA-Polymerase je nach den Versuchsbedingungen um den Faktor 2 - 4 (65, 66).

Die DNasen sind Phosphodiesterasen und gehören zu den Endonucleasen. Die DNase II bildet 3'-Monoester. Sie ist in allen tierischen Geweben zu finden, wird aber nur im sauren Milieu wirksam (3, 13, 44, 53 , 61, 62, 67).

Die DNase I baut die DNA bis zu Oligonucleotiden mit endständigen 5'-Monoestern ab (44, 61, 67). Sie benötigt, um aktiv werden zu können, einen pH-Wert nahe dem Neutralbereich und Anwesenheit von zweiwertigen Kationen (2o, 26, 41, 44, 46, 54, 57, 61, 67, 73). Sie tritt in besonders hoher Konzentration im P a n k r e a s auf (39, 4o). Dort ist sie an die Zymogen-Granula gebunden (67). Im Pankreassaft ist sie mit 1% an der Proteinkonzentration beteiligt (28, 33). Auch in anderen tierischen Geweben konnte die DNase I nachgewiesen werden (44, 67). Sie findet sich hier teils frei vor, teils ist sie an die Mitochondrien-Fraktion gebunden (5, 44, 61, 67).
Seit es gelang, die DNase I aus dem Pankreas des Rindes in kristalliner Form zu gewinnen (4, 24, 4o, 44, 61, 67), ist sie als standardisiertes Präparat mehr oder weniger gereinigt im Handel erhältlich und kann für biochemische Untersuchungen verwendet werden.

2.3. Inhibitoren der DNase I:

2.3.1. Künstliche Inhibitoren:

Zur Hemmung der DNase I stehen zahlreiche künstliche Inhibitoren zur Verfügung (67). Sie wirken zumeist durch Kationenentzug, durch Reaktion mit dem S u b s t r a t oder durch Fällung des Enzymproteins. Daneben gibt es noch eine Anzahl von Stoffen, deren Angriffspunkt in der Enzym-Substrat-Reaktion noch nicht bekannt ist.

2.3.2. Natürliche Inhibitoren:

Zu den natürlichen Inhibitoren der DNase I gehören vor allem solche von Ribonucleinsäure - und Polynucleotidcharakter - sie werden insbesondere als Inhibitoren bakterieller DNasen beschrieben (8, 9, 47, 55) -
und

solche von Proteincharakter - ihre Hemmwirkung konnte sowohl an bakteriellen DNasen (77, 78) als auch an DNasen von Mensch und Tier beobachtet werden (7, 3o, 37, 42, 44, 61, 67).

2.3.2.1 Vorkommen der Inhibitoren von Proteincharakter beim Tier

Ein Inhibitor der DNase I wurde zuerst im Pankreas des Rindes nachgewiesen (45, 54). Man fand ihn u.a. im Kropf der Taube (17), in den Blutzellen und im Knochenmark (21, 29, 31, 43, 68), in der Placenta (11), in Darm, Hoden, Milz, Gehirn, Herz, Lunge, Nieren und Leber (14, 22, 34, 5o, 76, 25). Auch in Tumoren konnte Inhibitoraktivität nachgewiesen werden (16). Bezogen auf den Proteingehalt hatten Lebergewebe die geringste, Milzgewebe die höchste Hemmaktivität der Pankreas-DNase (49).
Der Inhibitor ist im Cytoplasma lokalisiert (14, 5o).

2.3.2.2 Reinigung des Inhibitors:
Reinigung und kristalline Darstellung des Inhibitors gelangen erst kürzlich (18, 48, 49, 6o). Dabei waren aus Kälbermilz zwei Inhibitoren der DNase I zu isolieren (48).

2.3.2.3. Eigenschaften des Inhibitors:
Der Inhibitor ist ein Protein (43, 49, 5o), das durch Proteasen und durch Ansäuern und Alkylierung (49) zerstört werden kann. Der Inhibitor ist sehr hitze- und ziemlich kältelabil (14, 43, 34, 49, 76). Mit Ammoniumsulfat ist er fällbar (17, 49). Gegenüber SH-Gruppenblockern ist er nach ZALITE u. ROTH (76) nicht empfindlich, nach LINDBERG (48) wird der Inhibitor durch Zusatz von SH-Verbindungen stabilisiert.

2.3.2.4. Wirkungsmechanismus des Inhibitors:

Bei der Inhibitorwirkung handelt es sich um eine "nicht kompetitive" (2, 51, 58) Hemmung (14, 50). Nur bei niedriger Inhibitorkonzentration konnte eine lineare Beziehung zwischen Inhibitorkonzentration und Inhibitoraktivität festgestellt werden (17, 31, 50, 76).

3. Methodik

3.1. Tiermaterial:

Etwa 3oo Bruteier der Geflügelzuchtanstalt WIEGNER, München-Lohhof sowie weisse, männliche, etwa 2oo g schwere Ratten aus institutseigener Zucht.

3.2. Behandlung, Aufarbeitung und Aufbewahrung des Tiermaterials

3.2.1. Aufbereitung der Ratten

In V o r v e r s u c h e n wurde der bereits bekannte DNase I-Inhibitor der R a t t e n l e b e r in Anlehnung an die Methode von LOISELLE u. CARRIER (5o) und ZALITE u. ROTH (76) bestimmt. Dazu wurden zwei Ratten in Urethannarkose (o,7 ml der 25%igen Lösung in physiologischer Kochsalzlösung pro 1oo g Körpergewicht intraperitoneal) dekapitiert und entblutet. Die unmittelbar anschliessend entnommenen Lebern wurden mit o,25 M Saccharoselösung abgespült, auf Filterpapier abgetrocknet, gewogen und im Verhältnis 1:1o mit o,25 M Saccharoselösung in dest. Wasser versetzt. Die Organe wurden 2 min lang bei 1oooo U/min so schonend wie möglich homogenisiert (Homogenisator der Fa. BÜHLER, Tübingen) (je nach Embryogrösse 35- oder 7o ml-Gefässe mit einer oberen lichten Weite von 22 bzw. 38 mm und Messern von 18 bzw. 35 mm Durchmesser). Das Homogenat wurde in der Laborzentrifuge ("Junior II" der Fa. CHRIST.,M., Osterode/Harz) 3o min bei 4ooo U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde nach dem Dekantieren nochmals in der Kühlzentrifuge (Gerät der Fa. CHRIST., M., Osterode/Harz) 3o min bei 626o x g und einer Temperatur von + 7 ^{o}C zentrifugiert. Der nach diesem Arbeitsgang gewonnene Überstand wurde bei -15 ^{o}C aufbewahrt und diente als Inhibitorextrakt.

3.2.2. Aufbereitung der Embryonen:

Die Eier wurden bei 37,8°C und 6o% Luftfeuchtigkeit bebrütet. (Automatisch kontrollierter Motorbrutapparat der Fa. EHRET, Emmendingen). Den Eiern wurden zum erforderlichen Zeitpunkt Allentoisflüssigkeit und Embryo entnommen. Der Embryo wurde mit o,25 M Saccharoselösung abgespült, mit Filterpapier abgetrocknet, gewogen und anschliessend unter den gleichen Bedingungen wie die Rattenleber homogenisiert. In der Kühlzentrifuge wurde jedoch bei 25ooo x g zentrifugiert.

Der in der L a b o r z e n t r i f u g e (4ooo U/min) gewonnene Überstand wird in der Folge mit "Z-Überstand", der in der Kühlzentrifuge gewonnene Überstand mit "KZ-Überstand" bezeichnet.

3.3. Gleichzeitige Bestimmung von DNase I - und Inhibitoraktivität

3.3.1. Prinzip

Die DNase I-Aktivität wurde in Anlehnung an die von KUNITZ (39, 4o, 67) empfohlene Methode bestimmt: Hochmolekulare DNA erfährt unter dem Einfluss von DNase I eine Änderung ihrer Sekundärstruktur. Gleichzeitig treten DNA-Spaltprodukte auf. Beides führt zu einer der Geschwindigkeit der Reaktion sowie der Inkubationszeit proportionalen Extinktionszunahme bei 26o m/u (39, 4o, 67).

3.3.2. Reagentien

3.3.2.1. Desoxyribonuclease I (Desoxyribonucleat-Oligonucleotid-Hydrolase, E.C. 3.1.4.5.), lyophilisiert, rein, 3oooo dornase-E/mg, Präparat Nr. 1855o der Fa. SERVA, Heidelberg,

3.3.2.2. Magnesiumchlorid; $MgCl_2.6H_2O$ p.A., Merck Nr.5833,

3.3.2.3. o,1 N Salzsäure, Titrisol$^{(R)}$, Merck Nr. 9973,

3.3.2.4. Thymonucleinsäure, Na-Salz, hochmolekular nach HAMMARSTEN, Präparat Nr. 215439o der Fa. C.ROTH, Karlsruhe,

3.3.2.5. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan: Puffersubstanz, Merck Nr. 8382

3.3.2.6. p-Chlormercuribenzoat, Na-salz, rein, Präparat Nr. 169oo der Fa. SERVA, Heidelberg,

3.3.3. Lösungen

3.3.3.1. Desoxyribonuclease I: In 5mg%iger, wässr.Lösung. Diese Lösung war, bei -15°C aufbewahrt, etwa 3 Wochen lang haltbar. Sie wurde erst unmittelbar vor der Verwendung mit destilliertem Wasser auf die gewünschte Endkonzentration weiterverdünnt,

3.3.3.2. Magnesiumchlorid: In o,o312 M, wässriger Lösung,

3.3.3.3. Thymonucleinsäure: Die DNA wurde in destilliertem Wasser durch ca 5 h langes, automatisches Rühren gelöst und in o,5%iger Lösung zu Portionen von je 5 ml bis zur Verwendung bei -15°C aufbewahrt.

3.3.3.4. Tris-HCl-Puffer: 25 ml o,2 M Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan wurden mit o,1 N HCl auf den pH-Wert von 7,5 - bei 3o°C - eingestellt und das auf loo ml fehlende Volumen mit dest. Wasser ergänzt.

3.3.3.5. p-Chlormercuribenzoat: Wässrige Lösungen in Konzentrationen von $1o^{-1}$ bis $1o^{-7}$ M.

3.3.4. Ausführung

Für die Versuchsreihe eines Tages wurde die o,5%ige, wässrige DNA-Lösung (3.3.3.3.) mit der $MgCl_2$-Lösung (3.3.3.2.) im Verhältnis 1:2 gemischt. Dieses Gemisch wurde im Verhältnis 1:5 mit Tris-HCl-Puffer (3.3.3.4.) versetzt und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.
Die bereits ermittelten, optimalen Reaktionsbedingungen der DNase I (38, 7o) wurden übernommen. In drei Reagenzgläsern wurden die folgenden

A n s ä t z e vorbereitet:

a) Der Standard: Bestehend aus:
2,5 ml DNA-$MgCl_2$-Tris-HCl-Puffer-Gemisch,
o,1 ml o,25 M Saccharose,
o,5 ml dest. Wasser,

b) Die Kontrolle: Bestehend aus:
2,5 ml DNA-$MgCl_2$-Tris-HCl-Puffer-Gemisch,
o,1 ml o,25 M Saccharose,

c) Die Probe: Bestehend aus:
2,5 ml DNA-$MgCl_2$-Tris-HCl-Puffer-Gemisch,
o,1 ml Z- bzw. KZ-Überstand oder Allantoisflüssigkeit.

Je 1 ml der eingefrorenen Enzymlösung (3.3.3.1.) wurde der Kühltruhe entnommen und mit dest. Wasser auf die gewünschte Endverdünnung gebracht. Standard, Kontrolle, Probe und Enzymlösung wurden 5 min lang bei $3o^{\circ}C$ im Wasserbad inkubiert. Eine Minute vor Beginn der Messung wurden gleichzeitig Probe und Kontrolle mit o,5 ml der Enzymlösung versetzt und gründlich gemischt. Standard, Kontrolle und Probe wurden in (o,5 cm-)Quarzküvetten abgefüllt. Unmittelbar im Anschluß

daran wurden die Extinktionswerte von Kontrolle und Probe auf die Dauer von wenigen Minuten alle 3o Sekunden gegen den Standard bei 26o m/u photometriert (Spektralphotometer PMQ II der Fa. ZEISS, Stuttgart, Oberkochen, mit automatischer Hundertpunkteinstellung). Die Dichte der Probe wurde stets 3 Sekunden später abgelesen als die der Kontrolle. Die Differenz (Δ_E) zwischen der ersten Ablesung und den folgenden bildete die Grundlage für die Auswertung: Die durchlaufenen Extinktionsdifferenzen (Δ_E) wurden im Koordinatensystem gegen die Zeit (als Abszisse) aufgetragen. In dem Punkte, in dem die Reaktion des ungehemmten Enzyms den Wert Δ_E = o,3 erreichte, wurde die Senkrechte auf die Kurve der gehemmten Reaktion (= Restaktivitätskurve) gefällt. Die dem Schnittpunkt entsprechende Extinktionsdifferenz wurde abgelesen und prozentual auf den in der gleichen Zeit durchlaufenen Extinktionszuwachs der Kontrolle (entsprechend Δ_E = o,3 = loo%), bezogen. Damit erhält man die Inhibitoraktivität in P r o z e n t . Diese Form der Auswertung konnte angewandt werden, da die Inhibierungsaktivität von der durchlaufenen Extinktionsdifferenz und nicht von der Reaktionszeit abhängt. (Siehe Ergebnisse unter Abschnitt 4.5. der Arbeit).

3.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

3.4.1. Prinzip

Zur Bestimmung der s p e z i f i s c h e n Inhibitoraktivität wurde die Proteinkonzentration der Inhibitorzusätze nach der von BÜCHER u. Mitarbeitern (6) vereinfachten B i u r e t m e t h o d e gemessen: Das Protein wird mit Trichloressigsäure gefällt und der Biuret-Farbreaktion unterworfen. Die bei 546 m/u photometrierte spezifische Farbdichte ist dem jeweiligen Proteingehalt der Lösung proportional.

3.4.2. Reagentien:

3.4.2.1. $CuSO_4.5H_2O$ p.A., Merck Nr. 2790,

3.4.2.2. Kaliumjodid p.A., Merck Nr. 5043,

3.4.2.3. o,1 N Natronlauge p.A., Titrisol(R), Merck Nr. 9959,

3.4.2.4. Seignettesalz (K-Na-Tartrat) p.A., Merck Nr. 8087,

3.4.2.5. Trichloressigsäure zur Analyse, Merck Nr. 807.

3.4.3. Lösungen:

3.4.3.1. Biuretreagens:

Bestehend aus:

9,0 g Seignettesalz, 3,0 g $CuSO_4.5H_2O$, feingepulvert,

5,0 g Kaliumjodid sowie

NaOH, 0,2 N, ad 1000 ml

3.4.3.2. Trichloressigsäure: In 3,6 M, wässriger Lösung.

3.4.4. Ausführung

0,5 ml von Z- und KZ-Überstand bzw. Allantoisflüssigkeit wurden mit 0,35 ml dest. Wasser versetzt. Durch Zugabe von 0,15 ml 3,6 M Trichloressigsäure (3.3.4.2.) wurde das Protein gefällt. Nach 1/2-stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank wurde 15 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Anschliessend wurde dekantiert. Der Rückstand wurde in 4,9 ml dest. Wasser resuspendiert und mit 5 ml Biuretreagens (3.4.3.1.) gemischt. Als Standard diente eine Mischung von dest. Wasser und Biuretreagens im Verhältnis 1:2. Nach Ablauf von 1/2 h wurden Probe und Standard gegen dest. Wasser in 2 cm-Glasküvetten bei 546 mμ photometriert, und die Extinktion des Standards von der Extinktion der Probe abgezogen.

3.4.5. Berechnung des Proteingehaltes in Milligramm

Die mit Hilfe der Biuretreaktion ermittelte Extinktionsdifferenz zwischen Protein-haltiger Probe und Standard wurde mit dem Faktor 17 (60) multipliziert. Dadurch war die Pro-

teinkonzentration (in Milligramm/ml Überstand bzw. Allantoisflüssigkeit) zu berechnen.

3.5. Berechnung der mittleren Schwankung

Die mittlere Schwankung s_x der jeweils gewonnenen Einzelwerte um den Gruppendurchschnitt wurde nach der Formel

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}$$

errechnet.

Erläuterung der Indices:

$\bar{x}$ = Arithmetisches Mittel

x_i = experimentell ermittelte Einzelwerte

s_x = mittlere Schwankung der Einzelwerte um den Gruppendurchschnitt,

n = Anzahl der Doppelbestimmungen

4. Ergebnisse

4.1. Reaktionsablauf des DNA-Abbaues an ungehemmter DNase I

4.1.1. Enzymkonzentration:

Die Enzymkonzentration wurde so gewählt, dass die erste Ablesung der ungehemmten Reaktion am Photometer Extinktionswerte im Bereich von E = 0,16 - 0,23 ergab. Bei sehr hoher Enzymkonzentration (≯ 1,5 γ/Ansatz) konnte die erste Messung erst bei Extinktionswerten von 0,5 bis 0,7 vorgenommen werden. Die durchlaufene Extinktionsdifferenz war in den ersten 1,5 min ausserordentlich hoch. Sie sank in den folgenden Minuten so stark, dass die gleiche Extinktionsdifferenz zwischen erster und letzter Ablesung gemessen wurde wie für das weniger aktive Enzym. Daraus war zu schliessen, dass bei entsprechend hoher Enzymkonzentration die Reaktion bereits in der zweiten Minute der Messung weitgehend abgelaufen war.

4.1.2. Standardisierung

Trotz Abfüllung und Weiterbehandlung des Enzyms unter stets gleichen Bedingungen gelang es nicht, die Enzymaktivität in dem gewünschten Umfang zu standardisieren. Die Reaktionsgeschwindigkeit umfasste im Werte der 6. Reaktionsminute alle Extinktionsdifferenzen von Δ_E = 0,23 bis Δ_E = 0,8 (Abb. 1). Der Anstieg der bei 260 mμ gemessenen DNA-Hyperchromie in Abhängigkeit von der Reaktionszeit blieb aber bei allen Versuchen - ausgenommen sehr hohe Enzymaktivitäten (≯ 1,5 γ/Ansatz) - mindestens 5 min lang linear. Für den Vergleich des ungehemmten Enzyms mit dem gehemmten wurden daher die 2,5 - 4,5 Minuten nach Reaktionsbeginn gemessenen Werte verwandt. Innerhalb dieses Bereiches wurde ein Hyperchromiezuwachs von Δ_E = 0,3 für die ungehemmte Reaktion als prozentualer Bezug für die Auswertung der gehemmten Reaktion zugrunde gelegt. Dabei wurde auf die zeitliche Übereinstimmung die-

ses Wertes in den einzelnen Proben verzichtet. Die Gründe hierfür werden später dargelegt (s. dazu Teil 4.5.2. der Arbeit).

4.1.3. Stetigkeit der Reaktionen

Es wurde auch untersucht, inwieweit die Extinktionsdifferenz von Probe und Kontrolle im selben Zeitpunkt übereinstimmt, wenn beide Reaktionen a) ungehemmt, b) gehemmt ablaufen. In beiden Fällen betrug die maximale Abweichung der Probe von der Kontrolle 5%. Die Abweichung war entweder von Beginn der Reaktion an feststellbar oder entstand durch einen plötzlichen Sprung der Extinktion der Probe bzw. der Kontrolle während der Reaktion. Ein langsames Abweichen vom identischen Verlauf beider Kurven wurde nicht beobachtet.

4.2. Nachweis des Inhibitors

4.2.1. Rattenleber:

o,1 ml des frischgewonnenen Leberüberstandes hemmten rund 74% der DNase I-Aktivität. Nach 4-tägiger Aufbewahrung des Leberüberstandes in der Kühltruhe (bei $-15^{o}C$) wurden noch etwa 52% der Enzymaktivität gehemmt. Der Inhibitor hatte demnach durch die Lagerung rund 3o% seiner Ausgangsaktivität verloren.

4.2.2. Hühnerembryo:

Der Inhibitor wurde zunächst im 12 Tage alten Hühnerembryo nachgewiesen. o,1 ml des Z-Überstandes hemmten bis zu 88% des Enzyms. Der Durchschnittswert lag, wie im Verlauf der Untersuchungen festgestellt wurde, bei 79,4 $\pm$ 5,87%. o,3 ml der unverdünnten Allantoisflüssigkeit inhibierten mehr als 2o% der Kontrollreaktion.

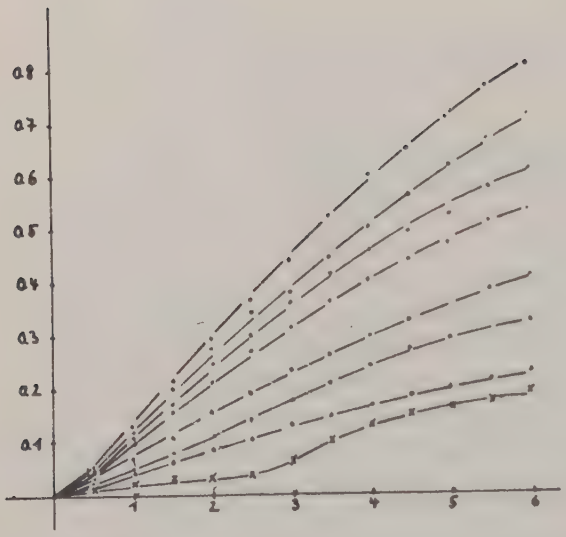

Abb. 1: Abbau von Desoxyribonucleinsäure (DNA) an krist. Pankreas-DNase vom Rind. Varianz der Reaktionsgeschwindigkeit trotz Konstanz von Enzymaufbereitung und Reaktionsbedingungen.

Abscisse: Reaktionszeit in Minuten
Ordinate: Geschwindigkeit der Enzymreaktion, ausgedrückt in bei 260 m µ durchlaufenen Extinktionsdifferenzen.
Punkt: DNase I-Reaktion, ungehemmt
Kreuz: DNase I-Restaktivität nach Inhibitorzusatz.

4.2.3. Zwei subcelluläre Inhibitorfraktionen im Hühnerembryo

Das durch Zentrifugieren bei 4000 U/min gewonnene Dekantat war praktisch Zell- und Zellkern-frei. Es enthielt noch Mitochondrien. Ihr Nachweis erfolgte phasenkontrastmikroskopisch (Ortholux-Mikroskop der Fa. E.LEITZ, Wetzlar, Objektiv 25 PV, Okular 12x). Wurde dieser Mitochondrien-haltige Überstand bei 25000xg in der Kühlzentrifuge weiterzentrifugiert, war der Überstand frei von Mitochondrien. Seine die DNase I-Reaktion inhibierende Aktivität lag mit durchschnittlich 74,6 ± 6,94% um 6% niedriger als die des Z-Überstandes. Im Rückstand war die ausgefällte Inhibitorfraktion nachweisbar. Bei höherer Beschleunigung des KZ-Überstandes - bis 151000xg in der Ultrazentrifuge (Gerät L-2 der Fa. BECKMAN, Rotor Ti 50) sank die Inhibitoraktivität nicht mehr. Wurde das Zellkern-freie Homogenat in der Kühlzentrifuge bei verschiedenen Geschwindigkeiten zentrifugiert, zeigte sich, dass der sedimentierbare Anteil der Inhibitoraktivität des Embryohomogenats zwischen 14000 und 16000 xg zusammen mit der Mitochondrienfraktion ausfällt. Der Z-Überstand wurde auch bei 35000xg in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde schichtweise zu je 2 ml abgesaugt. Von den 5 Schichten enthielten die mittleren 3 Fraktionen die stärkste Inhibitoraktivität (rd. 78,3%). Die unterste Fraktion inhibierte die DNase I weniger stark (72,7%). Am schwächsten hemmte die oberste Fraktion (68,9%).

4.3. Inhibitoraktivität in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration

Es wurden die 4 Tage gelagerten Z-Überstände aus Rattenleber- und Hühnerembryo-Homogenat untersucht.
Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: Inhibitoraktivität in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration der Ansätze.

Zeile 1: Volumen der zugesetzten Z-Überstände in ml,
Zeile 2: Verdünnungsgrad der Inhibitorzusätze,
Zeile 3: Hemmung der DNase I-Reaktion in Prozent durch den Z-Überstand von Rattenleberhomogenat,
Zeile 4: Hemmung der DNase I-Reaktion in Prozent durch den Z-Überstand von Hühnerembryo-Homogenat.

ml	o,2	o,1	o,1	o,1	o,1
Verdünnung	1:1o	1:1o	1:2o	1:4o	1:8o
Inhibitor-Aktivität der Rattenleber in %	72,7	52,3	26,o	25,o	15,o
Inhibitor-Aktivität des Hühnerembryo in %	---	81,o	71,o	33,3	16,o

Aus Tabelle 1 und Abb. 2 ergibt sich: Unter den gewählten Bedingungen war die Inhibitoraktivität von Rattenleber-Homogenat im Bereich von 15-25% Inhibierung, jene von Hühnerembryo-Homogenat in einem Bereich von 16-71% Hemmung der Inhibitorkonzentration der Ansätze direkt proportional.

4.4. Eigenschaften des Inhibitors

4.4.1. Temperaturempfindlichkeit

Um die Empfindlichkeit der Inhibitoraktivität des Hühnerembryos gegenüber Temperatureinflüssen zu untersuchen, wurden KZ- und Z-Überstand auf die Dauer von 2,5 - 2o min im Wasserbad auf loo°C erhitzt.

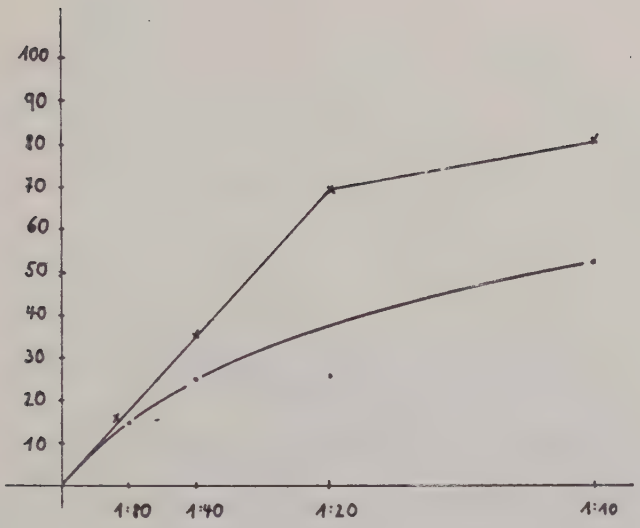

Abb. 2: Inhibitoraktivität von Rattenleber (Punkt) - und Hühnerembryo (Kreuz) - Homogenat in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration.

Abscisse: Inhibitorkonzentration der Ansätze. Angabe der Gewebskonzentration der o,1 ml-Zusätze der jeweiligen Z-Überstände.

Ordinate: Inhibitoraktivität: Hemmung der DNase I-Reaktion in Prozent.

Wie Tabelle 2 zeigt, wurde die DNase I-Hemmaktivität von Z- bzw. KZ-Überstand durch 2,5 min Erhitzen auf 100°C zu 64,5 bzw. 95% inaktiviert. Da die Inhibitoraktivität des Z-Überstandes auch nach 10 min Einwirkung von 100°C noch 9% ihrer Ausgangsaktivität behalten hatte, folgt, dass der Z-Überstand eine Inhibitorfraktion mit gegenüber der Hemmaktivität des KZ-Überstandes etwas erhöhter Hitzeresistenz enthält.

Tab. 2: Inhibitoraktivität von Z- und KZ-Überstand von Hühnerembryo-Homogenat in Abhängigkeit von der Dauer der Einwirkung von 100°C in Prozent, bezogen auf die nicht erhitzten Inhibitorextrakte (= 100%)

Zeit der Erhitzung in Minuten	0	2 1/2	10	20
Z-Inhibitoraktivität	100	15,5	9,1	0
KZ-Inhibitoraktivität	100	4,9	0	0

Der Inhibitor des Z-Überstandes verlor nach einer 4-stündigen Aufbewahrung im Kühlschrank etwa 4% seiner Ausgangsaktivität. Bei Zimmertemperatur aufbewahrt, zeigte die gleiche Inhibitoraktivität innerhalb der gleichen Zeit einen rund 30%igen Verlust.
Durch fünfmaliges Einfrieren und Auftauen war der Inhibitor zu 4% zu inaktivieren. Bei Lagerung in der Kühltruhe zeigte der Z-Inhibitor innerhalb von 4 Tagen 9,2%igen Aktivitätsverlust. Der KZ-Inhibitor verlor bei 4-bis 8-tägiger Lagerung durchschnittlich 16,8% (14,2 - 19,5%) seiner Anfangsaktivität. 0,3 ml der Allantoisflüssigkeit hemmten nach 4-6-tägiger Lagerung noch 12% der DNase I-Reaktion.

4.4.2. Nachweis von Sulfhydryl-Gruppen:

SH-Gruppen lassen sich durch p-Chlormercuribenzoat blockieren. 1/2 Stunde vor der Messung wurde dem Inhibitor p-Chlormercuribenzoat im Verhältnis 1:2 beigemengt. Es gelang bereits durch Zugabe von $o,5 \times 10^{-5}$ M wässriger p-Chlormercuribenzoatlösung den Inhibitor vollständig zu inaktivieren. Der Kontrolle wurden zu Beginn der Vorinkubierung o, 1 ml Saccharoselösung zugesetzt, die auch im Verhältnis 1:2 mit $o,5 \times 10^{-5}$ M p-Chlormercuribenzoat gemischt worden war. Das Enzym wurde von dieser Konzentration des Benzoats nur zu 18,3% gehemmt.

4.5. Zur Wirkungsweise von Enzym und Inhibitor:

4.5.1. Kinetik des DNA-Abbaues an DNase I in Gegenwart des Inhibitors

Der Inhibitor vermindert die Geschwindigkeit des Hyperchromiezuwachses der ungehemmten Reaktion. Bei hoher Inhibitoraktivität und einer Extinktionsdifferenz des ungehemmten Enzyms entsprechend $\Delta E = < o,65$ zeigt sich während der ersten 1 1/2 bis 2 1/2 Minuten der Reaktion eine Verzögerung des Reaktionseintrittes. In den meisten der untersuchten Fälle stieg die Restaktivitätskurve in den folgenden Minuten zwar langsamer aber für eine längere Zeit als das Diagramm der ungehemmten Reaktion linear an (s. Abb. 1 und 3). Es wurde untersucht, ob die anfängliche Verzögerung von der vom Enzym durchlaufenen, noch geringen Extinktionsdifferenz oder von der nach Einsetzen der Enzymreaktion abgelaufenen Zeit abhängt. Dazu wurde das Enzym sehr stark verdünnt. Die ungehemmte Reaktion zeigte so erst zu einem späteren Reaktionszeitpunkt die Extinktionsdifferenz, die es zuvor bereits nach 1 1/2 min - also im Bereich der anfänglichen Verzögerung - erreicht hatte. Hier war die Restaktivität wesentlich höher als im beim ersten Versuch ermittelten Vergleichspunkt. Die

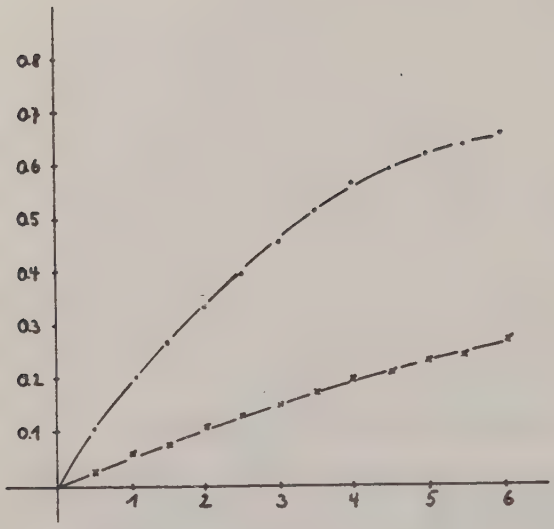

Abb. 3: Geschwindigkeit des DNA-Abbaues an DNase I aus Rinderpankreas ohne (Punkt) und mit (Kreuz) DNase I-Inhibitorzusatz.

Abscisse: Reaktionszeit in Minuten.
Ordinate: Geschwindigkeit der DNase I-Reaktion; Angabe der in der jeweiligen Reaktionszeit bei 260 m µ durchlaufenen Extinktionsdifferenz.

Inhibitoraktivität war entsprechend geringer. Daraus ist zu schliessen, dass die anfängliche Verzögerung von der seit Beginn der Enzymreaktion abgelaufenen Zeit und nicht von der durchlaufenen Extinktionsdifferenz abhängt (Abb. 5 und 6).
Allerdings lässt sich die anfängliche Verzögerung nicht mehr bei Extinktionsdifferenzen von $\Delta E > 0{,}7$ zwischen erster und letzter Ablesung nachweisen.

4.5.2. Abhängigkeit der Inhibitoraktivität von Enzymaktivität und Reaktionszeit:

Da sich die Inhibitoraktivität während eines Reaktionsablaufes zum Teil beträchtlich verminderte (s. Abb. 4), wurde am selben Inhibitor geprüft, ob die Änderung der Inhibitoraktivität von der Reaktionszeit oder von der vom Enzym durchlaufenen Extinktionsdifferenz abhängt.

Aus den Abbildungen 4 - 6 ergibt sich:

1. Die Inhibierung ist von der vom Enzym durchlaufenen Extinktionsdifferenz abhängig.
2. Die Inhibitoraktivität ist unabhängig von der Zeit der Einwirkung des Inhibitors auf das Enzym.
3. Bei geringer Aktivität des Enzyms (ungehemmte Reaktion: $\Delta_E < 0{,}22$) ist die Hemmung der DNase gering. Sie nimmt mit steigender Hyperchromie bis zu einem Kontrollwert von $\Delta_E = 0{,}22$ zu. Erhöht sich die von der Kontrollreaktion durchlaufene Extinktionsdifferenz weiter, und zwar bis etwa $\Delta_E = 0{,}55$, vermindert sich der prozentuale Hemmbetrag wieder.
4. Sehr hohe Extinktionsdifferenzen lassen sich durch Erhöhung der Enzymkonzentration oder durch Verlängerung der Messung über die Reaktionszeit von 6 min hinaus erreichen. In beiden Fällen erfolgen die Messungen des Hyperchromiezuwachses bereits im asymptotischen Teil der Kurve (s. dazu Teil 4.1.1. der Arbeit). Die Kurve der

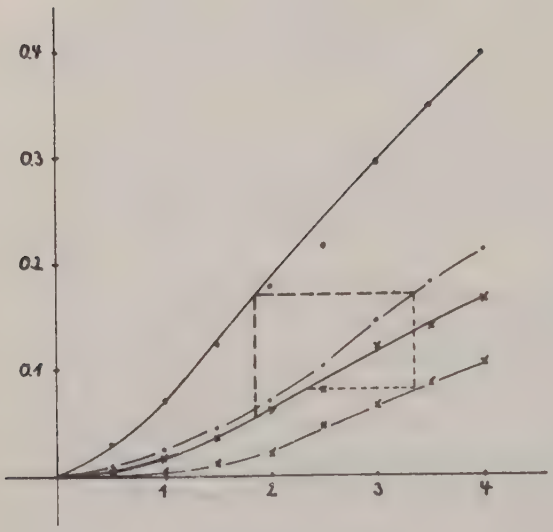

Abb. 4: Geschwindigkeit des DNA-Abbaues an DNase I aus Rinderpankreas ohne (Punkt) und mit (Kreuz) Inhibitorzusatz in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Abscisse: Reaktionszeit in Minuten.
Ordinate: Geschwindigkeit der Enzymreaktion. Angabe der in der jeweiligen Reaktionszeit bei 260 mμ durchlaufenen Extinktionsdifferenz. Die durchbrochenen und die ausgezogenen Linien sind miteinander unmittelbar vergleichbar. Die Linienführung kennzeichnet unterschiedliche Enzymaktivitäten.

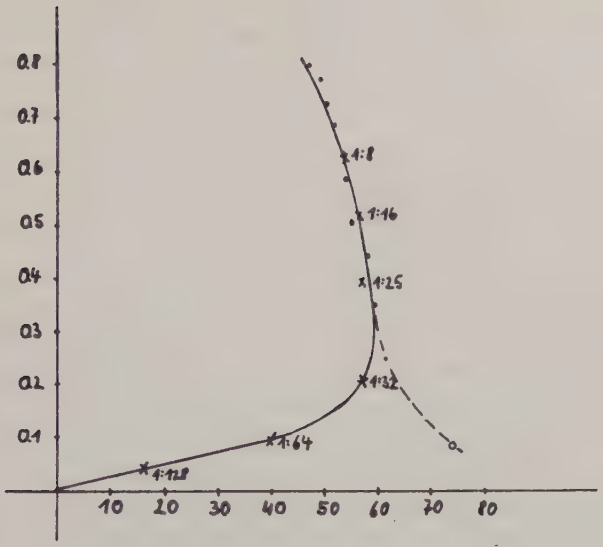

Abb. 5: Inhibitoraktivität in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration und von der Reaktionszeit.

Abscisse: Inhibitoraktivität in Prozent.
Ordinate: Die von der ungehemmten DNase I-Reaktion durchlaufene Extinktionsdifferenz Δ_E.

Kreuz: Ablauf der gehemmten Reaktion bei durch Varianz der Enzymkonzentration veränderter Extinktionsdifferenz Als Grundlage dienten die jeweils nac 4 min abgelegenen Werte.

Punkt: Ablauf der gehemmten Reaktion bei dur Varianz der Reaktionszeit veränderter Extinktionsdifferenz.
Der von dem Verlauf der durchgezogene Linie nicht miterfasste Punkt (= Krei kennzeichnet die anfängliche Verzögerung der Enzymreaktion in Gegenwart des Inhibitors.

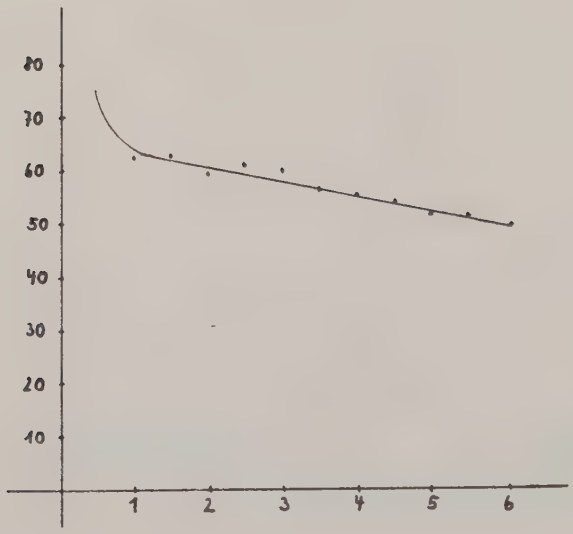

Abb. 6: Inhibitoraktivität in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Abscisse: Reaktionszeit in Minuten.
Ordinate: Inhibitoraktivität in Prozent, bezogen auf die nicht gehemmte DNase I-Reaktion (= 100%).

gehemmten Reaktion steigt aber weiter - linear - an. Damit sinkt die Inhibitoraktivität nur scheinbar. Die tatsächliche Inhibitoraktivität ist aber durch Korrektur dieses Fehlers zu errechnen.

5. Die somit methodisch bedingte Abweichung der experimentell ermittelten Inhibitoraktivität von der bei einer bestimmten, von der Kontrollreaktion durchlaufenen Extinktionsdifferenz (hier Δ_E = o,3) messbaren Hemmaktivität ist durch Berechnung der Ausgleichsgeraden für die entsprechend der von den Kontrollreaktionen jeweils durchlaufenen Extinktionsdifferenz experimentell ermittelten Hemmaktivitäten korrigierbar (Abb. 7). Die Auswertung der Versuche wurde in dem Teil der Kurve vorgenommen, in dem die Inhibitoraktivität linear sank (d.i. Δ_E = o,22 - o,55). Dazu wurden die Werte der Inhibitoraktivität sämtlicher Proben gegen die von den Kontrollansätzen durchlaufene Extinktionsdifferenz aufgetragen, und die jeweiligen Ausgleichsgeraden berechnet (Abb. 7).

   Die Gleichungen für die Ausgleichsgeraden lauten, wie folgt:

   a) den frischgewonnenen Z-Überstand
      % Inhibierung = 1o5,9 - o,o75 $\Delta E \cdot 1o^3$
      Die Abweichung von der Geraden betrug s = $\pm$ 5,87

   b) den KZ-Überstand
      % Inhibierung = 1o5 - o,o895 $\cdot \Delta E \cdot 1o^3$
      Die Abweichung von der Geraden betrug s = $\pm$ 6,94

4.6. Hemmtyp (2, 32, 58).

4.6.1. Einführung in die Theorie:

Die Inhibitoren werden im allgemeinen in drei Hemmtypen eingeteilt:

a) solche mit kompetitiver Hemmung. Hierbei konkurrieren Inhibitor und Substrat miteinander reversibel um die substratbindende Gruppe des Enzyms. Die Inhibitorbindung findet am Co-Ferment statt. Die Michaeliskonstante (Km) wird scheinbar erhöht. Die maximale Geschwindigkeit (V_{max}) bleibt unverändert.

b) solche mit nicht kompetitiver Hemmung. Hierbei lagert sich der Inhibitor am Fermentmolekül an, verhindert die Bildung oder vermindert die Spaltungsgeschwindigkeit des Enzymsubstratkomplexes. Die Bindungsverhältnisse am Co-Ferment werden dadurch nicht beeinflusst. Die Michaeliskonstante bleibt unverändert. Dagegen wird die maximale Geschwindigkeit herabgesetzt.

c) solche mit unkompetitiver Hemmung. Hierbei reagiert der Inhibitor mit dem Enzym-Substrat-Komplex. V_{max} und K_m vermindern sich in Gegenwart des Inhibitors.

Man ermittelt den Hemmtyp u.a. mit Hilfe der Sättigungskurven von ungehemmter oder gehemmter Reaktion oder deren Ableitung nach LINEWEAVER u. BURK (2, 32, 58). Da letztere im vorliegenden Fall nicht anwendbar war - ihr Aussagewert ist darüberhinaus bei der bislang noch weitgehend ungeklärten Reaktionskinetik der DNasen ungewiss (44, 61, 67) -, wurde der Hemmtyp mit Hilfe der Sättigungskurven ermittelt (Abb. 8 und 9).
Wie aus Abb. 8 und 9 ersichtlich, ist $V_{max} \neq V_{imax}$* .
Der Hemmtyp ist danach nicht kompetitiv. Die Substratsättigung bei halbmaximaler Geschwindigkeit (K_m) ist aber ebenfalls ungleich der des gehemmten Enzyms. Es lassen sich MICHAELIS-Konstanten von $K_m = 1{,}965.10^{-7}$ Mol/Liter und $K_{im} = 2{,}525.10^{-7}$ Mol/Liter errechnen. Durch den Inhibitor wird somit auch die Affinität des Enzyms zum Substrat herabgesetzt.

---

* V_{imax} = Geschwindigkeit der Enzym-Substratreaktion bei Substratsättigung in Gegenwart des Inhibitors,

** K_{im} = Michaeliskonstante in Gegenwart des Inhibitors

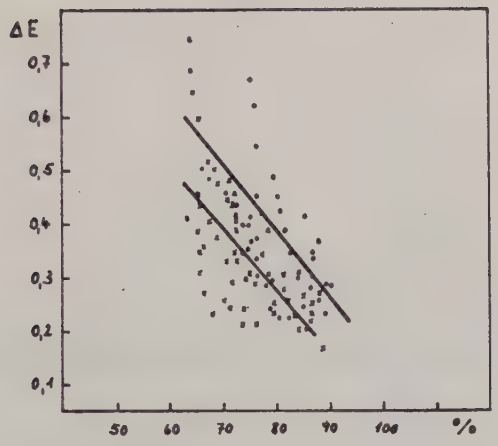

Abb. 7: Inhibitoraktivität in Abhängigkeit von den von der ungehemmten Reaktion durchlaufenen Extinktionsdifferenzen.

Abscisse: Hemmung der DNase I-Reaktion in P r o z e n t .

Ordinate: Die von der ungehemmten DNase I-Reaktion bei 260 m µ durchlaufenen Extinktionsdifferenzen.

Punkt: Z-Überstand des Hühnerembryo-Homogenats,

Kreuz: KZ-Überstand des Hühnerembryo-Homogenats.

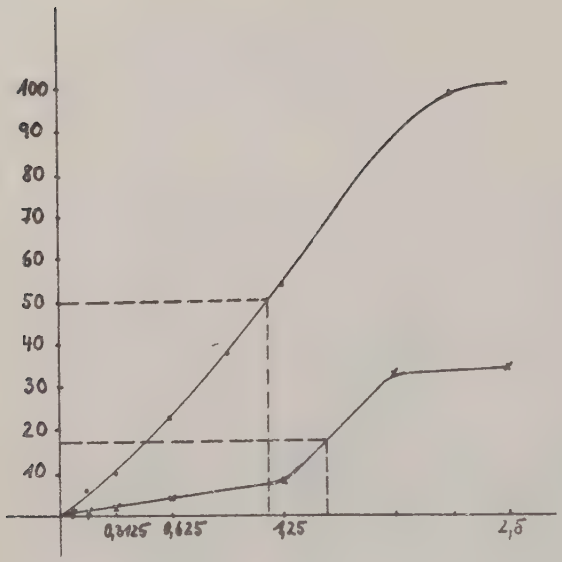

Abb. 8: Geschwindigkeit des DNA-Abbaues an DNase I in Abwesenheit (Punkt) und in Gegenwart (Kreuz) des DNase I-Inhibitors aus Hühnerembryo-Homogenat in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

Abscisse: DNA-Konzentration im Milligramm pro 3 ml Ansatz,

Ordinate: Geschwindigkeit des DNA-Abbaues an DNase I in Prozent der DNA-Abbaurate bei Substratsättigung.

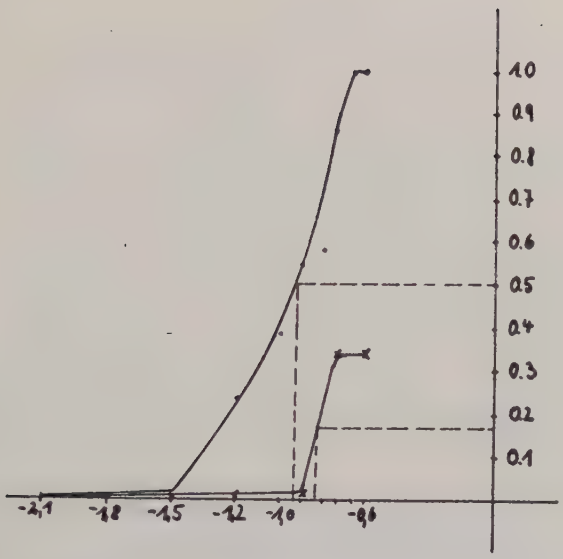

Abb. 9: Geschwindigkeit des DNA-Abbaues an DNase I ohne (Punkt) und mit (Kreuz) DNase I-Inhibitorzusatz aus Hühnerembryo-Homogenat in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

Abscisse: DNA-Konzentration in Milligramm pro 3 ml Ansatz, in logarithmischem Maßstab.

Ordinate: Quotienten aus der bei der jeweiligen Substratkonzentration gemessenen Reaktionsgeschwindigkeit (V) und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung (V_{max}). Der Reaktionsgeschwindigkeit liegt die in der Zeiteinheit bei 260 mμ durchlaufene Extinktionsdifferenz zugrunde.

Aus den Abbildungen 8 und 9 folgt somit:
Der Hemmtyp des Inhibitors des Hühnerembryos bietet sich vorwiegend als Mischtyp dar, da sich sowohl die halbmaximale Geschwindigkeit als auch die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit ändern. Da aber die Substrataffinität der DNase I in Gegenwart des Inhibitors abnimmt, ist die Hemmung nicht im Sinne einer unkompetitiven Hemmung, d.h. als Reaktion des Inhibitors mit dem Enzym-Substrat-Komplex deutbar. Es bleibt zu untersuchen, inwieweit methodische Gegebenheiten eine Änderung der Substrataffinität der DNase I unter dem Einfluss des embryonalen Inhibitors vortäuschen.

4.7. Zum Verhalten des DNase I-Inhibitors des Hühnerembryos während der Ontogenese

Die Embryonen wurden vor der Zerkleinerung im Verhältnis 1:2o mit o,25 M Saccharoselösung versetzt. Die Inhibitoraktivität in Prozent wurde anhand der Kurve für Δ_t = o,3 (= 1oo%) des ungehemmten Enzyms ermittelt.

4.7.1. Inhibitoraktivität, bezogen auf die Gewichtseinheit Frischgewicht

Wie Tab. 3 und Abb. 1o zeigen, steigt die Inhibitoraktivität bis zum 7. Tag (um knapp 2o%) und vermindert sich am 9.Tag wieder auf den am 5.Entwicklungstag ermittelten Wert. Sie vergrössert sich zum 11.Tag wieder auf den Wert des 7.Tages und nimmt dann bis zum 15.Tag nur mehr wenig zu (Tab. 3, Abb. 1o).

Tab. 3: Inhibitoraktivität (in Prozent) des Homogenats von Hühnerembryonen in Abhängigkeit von der Bebrütungszeit, bezogen auf die Gewichtseinheit Frischgewicht.

Zeile I: Z-Überstand, Bebrütungszeit in Tagen,
Zeile II: KZ-Überstand, Bebrütungszeit in Tagen,
Zeilen 1-6: Inhibitoraktivität der einzelnen, untersuchten Homogenate in Prozent,
Zeile III: Durchschnittliche Inhibitoraktivität der untersuchten Homogenate in Prozent,
Zeile IV: Mittlere Abweichungen der Einzelwerte vom Gruppendurchschnitt in Prozent

I	5	7	9	11	13	15	II 5	7	9	11	13	15
1			52,o	68,7	57,3	59,7			39,7	5o,o	47,o	58,3
2			56,o	66,6	58,9	67,o			4o,3	5o,3	47,7	64,3
3			47,3	69,o	64,3	66,3			43,o	56,3	49,6	65,o
4			55,3	43,3	64,3	6o,o			45,7	39,3	59,3	44,3
5			58,3	58,3	45,6	6o,6			51,o	42,3	43,3	47,3
6			5o,7	55,6	72,3	6o,o			39,o	53,o	46,3	46,3
III	52,6	6o,7	53,3	61,o	6o,7	62,3	4o,1	48,6	43,1	48,3	49,o	54,3
IV	±1,3	±2,7	±4,26	±1o,o8	±8,o7	±2,83	±2,1	±o,7	±4,59	±6.49	±5,5	±9,4

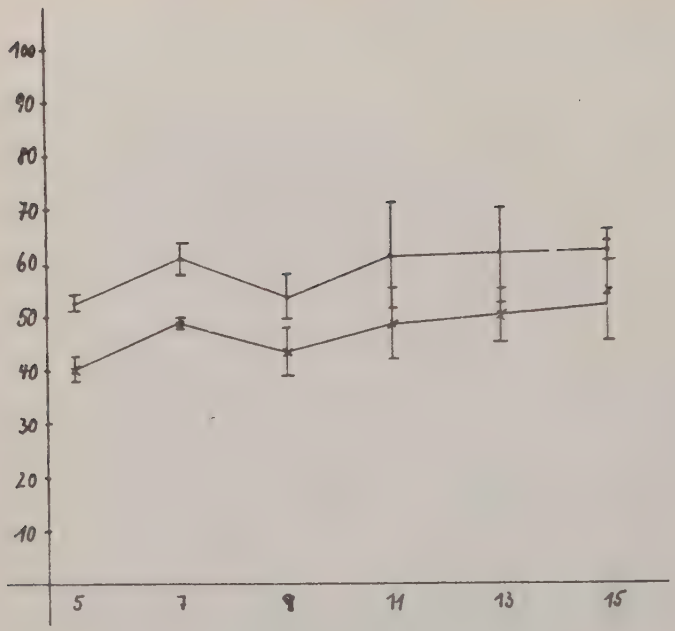

Abb. 10: Inhibitoraktivität von Hühnerembryo-Homogenaten in Abhängigkeit von der Bebrütungszeit, bezogen auf die Gewichtseinheit Frischgewicht.

Abscisse: Bebrütungszeit in Tagen.
Ordinate: Inhibitoraktivität in Prozent.
Punkt: Z-Überstand,
Kreuz: KZ-Überstand.

4.7.2. Inhibitoraktivität, bezogen auf die Gewichtseinheit Protein

4.7.2.1. Proteinkonzentration

Tab. 4: Proteinkonzentration der Hühnerembryo-Homogenate in mg/ml des Z-Überstandes, in Abhängigkeit von der Bebrütungszeit in Tagen

Bebrütungstag	5	7	9	11	13	15
1.Embryo	o,816	o,858	o,91o	1,165	1,412	2,o82
2.Embryo	o,834	o,858	o,858	1,288	1,327	1,659
3.Embryo			o,88o	1,o2o	1,368	1,549
4.Embryo			o,935	1,113	1,398	1,545
5.Embryo			o,918	1,249	1,284	1,83o
6.Embryo			o,918	1,212	1,254	2,142
Mittelwerte	o,825	o,858	o,9o3	1,175	1,34o	1,8o1

Tab. 5: Proteinkonzentration der Hühnerembryo-Homogenate in mg/ml des KZ-Überstandes, in Abhängigkeit von der Bebrütungszeit in Tagen

Bebrütungstag	5	7	9	11	13	15
1.Embryo	o,621	o,548	o,556	o,765	o,944	1,564
2.Embryo	o,51o	o,548	o,612	o,655	o,918	1,2o8
3.Embryo			o,744	o,595	o,961	1,268
4.Embryo			o,612	o,774	o,918	1,182
5.Embryo			o,592	o,727	o,833	1,39o
6.Embryo			o,578	o,774	o,765	1,688
Mittelwerte	o,565	o,548	o,616	o,715	o,888	1,383

Wie Tabelle 4 und 5 zeigen, bleibt die Proteinkonzentration des Hühnerembryos bis zum 1o.Tag der Entwicklung praktisch konstant und nimmt in der Folge exponentiell zu (s. dazu auch die Abb. 11).

4.7.2.2. Inhibitoraktivität

Tab. 6: Inhibitoraktivität in Prozent in o,1 ml des Z-Überstandes, bezogen auf die Proteinkonzentration von 1,o ml des Z-Überstandes

Bebrütungstag	5	7	9	11	13	15
1.Embryo	62,9	73,8	57,2	59,o	4o,o6	28,7
2.Embryo	64,8	67,6	65,3	51,7	44,4	4o,4
3.Embryo			53,8	67,6	47,o	42,8
4.Embryo			59,2	39,8	46,o	38,4
5.Embryo			63,5	46,7	35,2	33,1
6.Embryo			55,2	45,9	57,6	28,o
Mittelwerte	63,8	7o,7	59,1	51,9	45,3	34,6
Abweichungen von den Mittelwerten	±o,95	±3,1	±4,58	±1o,o6	±7,78	±6,26

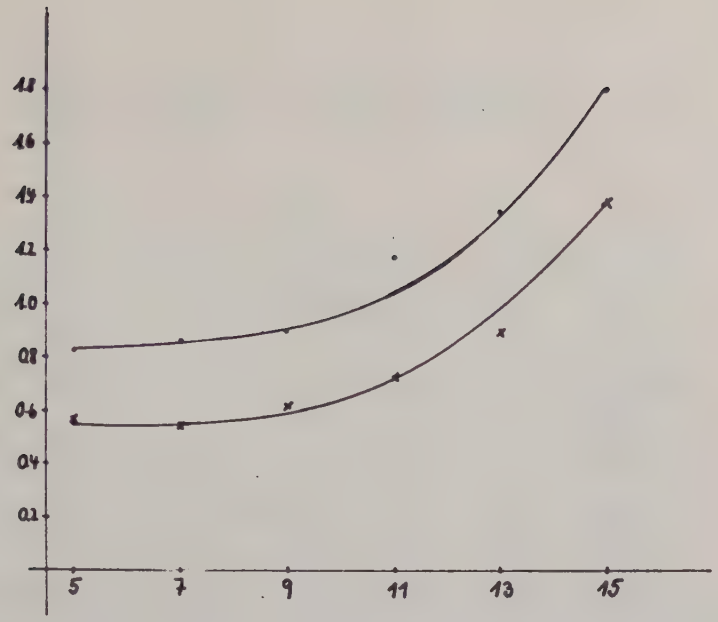

Abb. 11: Proteinkonzentration der Hühnerembryo-Homogenate in Abhängigkeit von der Entwicklungszeit in Tagen.

Abscisse: Bebrütungszeit in Tagen.
Ordinate: Proteinkonzentration in mg / ml des jeweiligen Z-Überstandes (Punkt) bzw. KZ-Überstandes (Kreuz) der zentrifugierten Embryohomogenate.

Tab. 7: Inhibitoraktivität (in Prozent) in o,1 ml des KZ-Überstandes, bezogen auf die Proteinkonzentration von 1,o ml des KZ-Überstandes.

Bebrütungstag	5	7	9	11	13	15
1.Embryo	68,o	87,4	71,4	65,3	49,8	37,3
2.Embryo	74,5	89,8	65,8	76,8	52,o	53,3
3.Embryo			57,8	94,6	51,6	51,2
4.Embryo			74,6	5o,8	64,6	37,5
5.Embryo			85,7	58,2	52,o	34,●
6.Embryo			67,4	68,5	6o,9	28,6
Mittelwerte	71,2	88,6	69,9	67,5	55,2	39,3
Abweichungen von den Mittelwerten	±3,25	±1,2	±9,4	±14,87	±6,o5	±7,84

Die Inhibitoraktivität in % (der Zähler) erhöht sich bis zum 7.Tage und nimmt anschliessend bis zum 9.Tage stark ab. Die Proteinkonzentration in mg/ml (der Nenner) bleibt bis etwa zum 1o.Tage unverändert (Tab. 6 und 7, Abb. 12). Der Quotient aus beiden ergibt

bis zum 7.Tag einen starken Anstieg, bedingt durch die zunehmende Inhibitoraktivität,

bis zum 9.Tag einen energischen Abfall der spezifischen Inhibitoraktivität, verursacht durch die fallende Inhibitoraktivität,

bis zum 11.Tag einen verlangsamten Abfall, hervorgerufen durch die zunehmende Inhibitoraktivität bei

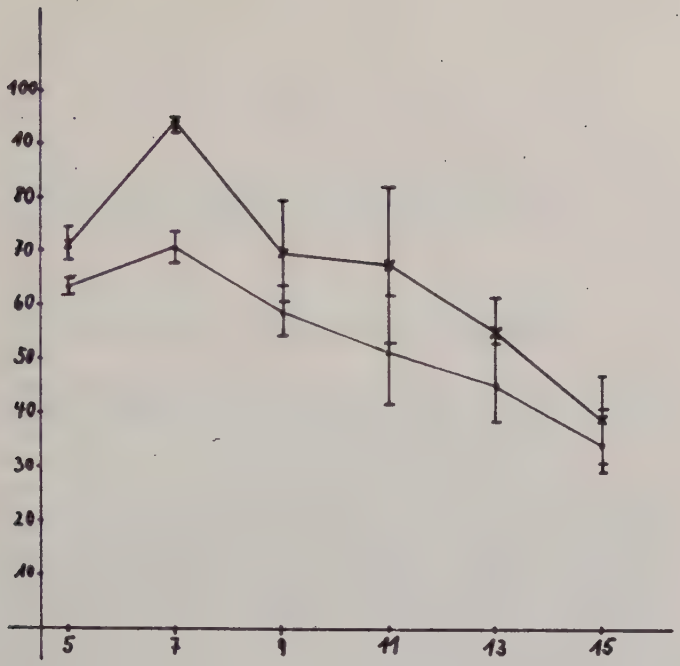

Abb. 12: Aktivität des DNase I-Inhibitors aus Hühnerembryo-Homogenat in Prozent, in Abhängigkeit von der Entwicklungszeit in Tagen, bezogen auf die Proteinkonzentration.

Abscisse: Bebrütungszeit in Tagen.
Ordinate: Inhibitoraktivität in Prozent, bezogen auf die Proteinkonzentration von 1 ml des jeweiligen Embryohomogenats.
Kreuz: KZ-Überstand,
Punkt: Z-Überstand der zentrifugierten Homogenate.

sich demgegenüber stärker vergrößernder Proteinkonzentration und

von dem 11.Tage an weiteren starken Abfall der spezifischen Inhibitoraktivität, bedingt durch den Anstieg der Proteinkonzentration gegenüber einer nur noch ganz geringen Zunahme der Inhibitoraktivität.

4.7.3. Inhibitoraktivität, bezogen auf den Gesamtembryo

Tab. 8: DNase I-Inhibitoraktivität des Gesamtembryos während der Ontogenese im Z-Überstand (Zeile 3) bzw. KZ-Überstand (Zeile 4).

Bebrütungstage	5	7	9	11	13	15
Gewicht in g	o,172	o,725	1,718	3,352	6,723	12,954
Z-Überstand	9,o5	44,o	91,5	2o2,2	4o8,o	8o6,o
KZ-Überstand	6,9	35,2	74,o	161,8	329,5	7o3,o

Wie Tabelle 8 und Abb. 13 erkennen lassen, nimmt die DNase I-Inhibitoraktivität des G e s a m t e m b r y o s vom 5. - 15.Entwicklungstag exponentiell etwa um den Faktor 1oo zu.

4.8. Verhältnis der Inhibitoraktivitäten von Z- und KZ-Überstand für die DNase I-Inhibitoraktivität

Um festzustellen, wie sich der abzentrifugierbare Anteil des Inhibitors während der Ontogenese verhält, wurde das Verhältnis der Hemmaktivitäten von KZ-Überstand und Z-Überstand in Beziehung gesetzt.

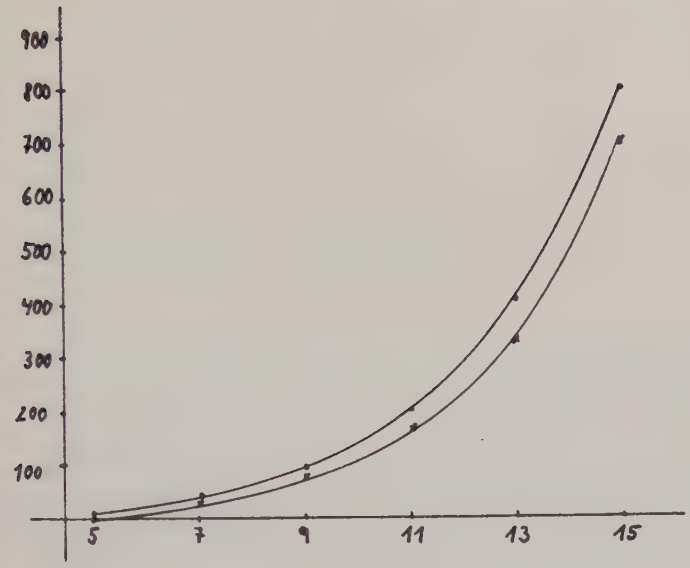

Abb. 13: Inhibitoraktivität des Hühnerembryos in Prozent, bezogen auf den Gesamtembryo.

Abscisse: Bebrütungszeit in Tagen.
Ordinate: Gesamt-Inhibitoraktivität des Hühnerembryos, als Produkt aus Gewicht und Inhibitoraktivität im Z-Überstand (Punkt) bzw. KZ-Überstand (Kreuz).

Tab. 9: Verhältnis der Mittelwerte/des KZ-Überstandes (in Prozent) zum Z-Überstand (in Prozent) während der Ontogenese

Bebrütungstage	5	7	9	11	13	15
KZ : Z	o,763	o,8	o,8o8	o,793	o,8o7	o,872

Aus Tabelle 9 geht hervor, dass am Anfang der Entwicklung am meisten Inhibitor abzentrifugiert werden kann. Zwischen dem 7. und 13.Tag bleibt die abzentrifugierte Menge praktisch gleich. In den nun folgenden Tagen der Entwicklung sinkt der abzentrifugierbare Anteil geringgradig.
Der Vollständigkeit halber wurde das Verhältnis der Proteinkonzentration pro ml des KZ-Überstandes zum Z-Überstand untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 1o und Abb. 14 graphisch zusammengestellt.

Tab. 1o: Verhältnis der Proteinkonzentrationen von KZ-Überstand und Z-Überstand der zentrifugierten Embryohomogenate in Abhängigkeit von der Entwicklungszeit in Tagen

Bebrütungstage	5	7	9	11	13	15
KZ:Z (Protein mg/ml)	o,685	o,629	o,683	o,6o9	o,663	o,768

Das Verhältnis der Proteinkonzentration hat am 5. und 9.Tag ein Maximum, sinkt am 7. und 11.Tag auf ein Minimum und erhöht sich vom 11. Tage wieder. Der abzentrifugierbare Proteinanteil schwankt stark. Am 7. und 11.Tag wird am meisten abzentrifugiert, um den 9.Tag sehr wenig. Vom 11.Tag an vermindert sich der abzentrifugierbare Anteil.

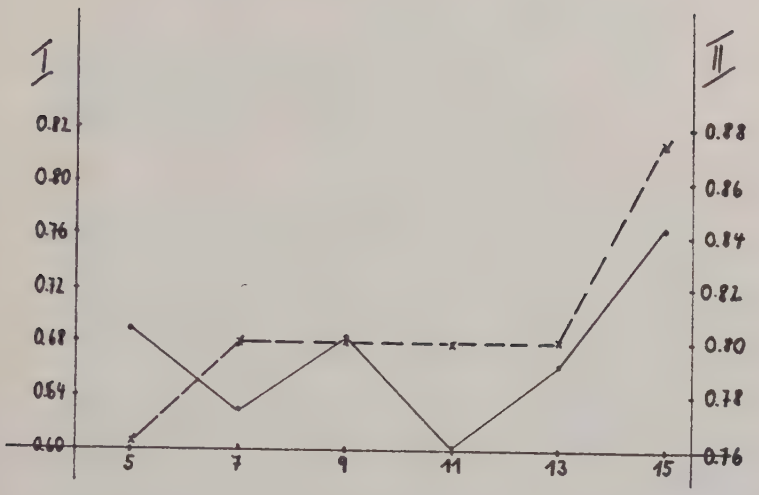

Abb. 14: Verhältnis der DNase I-Inhibitoraktivität (in Prozent, bezogen auf die Gewichtseinheit Frischgewicht) von KZ- und Z-Überstand (Kreuz) sowie der Proteinkonzentration von KZ- und Z-Überstand (Punkt) der zentrifugierten Hühnerembryo-Homogenate in Abhängigkeit von der Bebrütungszeit in Tagen.

Abscisse: Bebrütungszeit in Tagen.
Ordinate I: Verhältnis der Inhibitoraktivitäten,
Ordinate II: Verhältnis der Proteinkonzentrationen.

4.9. Verteilung des Inhibitors auf einzelne Organe

Tab. 11: Verteilung des DNase I-Inhibitors des 17 Tage alten Hühnerembryos auf einzelne Organe im Z-Überstand
Zeile 2: Inhibitoraktivität in Prozent, bezogen auf die Gewichtseinheit Frischgewicht,
Zeile 3: Proteinkonzentration in mg/ml des jeweiligen, 1:2o verdünnten Organhomogenats,
Zeile 4: Inhibitoraktivität in Prozent, bezogen auf 1 mg Protein

Organe	Leber/Galle	Magen/Darm	Milz	Herz
Inhibitor-aktivität	49,o	51,o	91,o	43,3
Proteinkonzen-tration	16,95	1,68	11,6	1,37
Inhibitor-aktivität, bezogen auf 1 mg Protein	2,89	3o,3	7,825	31,65
Frischgewicht der Organe in Gramm	o,478	1,o73	o,oo7	o,189
Inhibitoraktivität, bezogen auf das Gesamtorgan	23,45	54,7	o,o67	8,13

Tab. 12: Verteilung des DNase I-Inhibitors des 17 Tage alten Hühnerembryos auf einzelne Organe im KZ-Überstand
Zeile 2: Inhibitoraktivität in Prozent, bezogen auf die Gewichtseinheit Frischgewicht,
Zeile 3: Proteinkonzentration in mg/ml des jeweiligen, 1:2o verdünnten Organhomogenats,
Zeile 4: Inhibitoraktivität in Prozent, bezogen auf 1 mg Protein.

Organe	Leber/Galle	Magen/Darm	Milz	Herz
Inhibitoraktivität	39,o	5o,o	81,6	28,6
Proteinkonzentration	6,89	1,44	----	o,825
Inhibitoraktivität, bezogen auf 1 mg Protein	5,66	34,7	----	34,7
Gewicht der Organe in Gramm	o,478	1,o73	o,oo7	o,189
Inhibitoraktivität, bezogen auf das Gesamtorgan	18,67	53,65	o,o6	5,41

Bezogen auf die Gewichtseinheit F r i s c h g e w i c h t , nahm die Inhibitoraktivität der Z- und KZ-Überstände der untersuchten Organhomogenate in der Reihenfolge Milz $\gg$ Magen/Darm $>$ Leber/Galle $>$ Herz ab. Diente die jeweilige Proteinkonzentration als Bezugsbasis, lautete die analoge Reihe Herz = Magen/Darm $>>$ Milz $>$ Leber/Galle. Bei Bezug auf das jeweilige Gesamtorgan zeigte sich die Reihe der untersuchten Organe in nachstehender Reihenfolge: Magen/Darm $\gg$ Leber/Galle $>$ Herz $>$ Milz. Die sedimentierbare DNase I-Inhibitorfraktion nahm in der Reihenfolge Herz $>$ Leber/Galle $>$ Milz $>$ Magen/Darm ab (Tab. 11 und 12).

4.1o. Ontogenese des Inhibitors in der Allantoisflüssigkeit

Von je drei Embryonen wurden im Zeitraum vom 9. - 15. Entwicklungstag gleiche Mengen der Allantoisflüssigkeit entnommen, gemischt und auf DNase I-Hemmaktivität untersucht. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 13.

Tab. 13: Verhalten der DNase I-Inhibitoraktivität der Allantoisflüssigkeit des Hühnerembryos vom 9. - 15.Entwicklungstag, in Prozent

Bebrütungstage	9	11	13	15
Inhibitoraktivität (1.Versuch)	o	o	19,3	2o,2
Inhibitoraktivität (2.Versuch)	14	o	27,7	o

Wie Tabelle 13 zeigt, war eine DNase I-Inhibitoraktivität in der Allantoisflüssigkeit mit Sicherheit nur am 13. Bebrütungstag nachzuweisen. Da die Proteinkonzentration der Allantoisflüssigkeit des Embryos gleichzeitig ein Minimum durchläuft (19, 38), ist auch die spez. DNase I-Inhibitoraktivität um den 13.Bebrütungstag am höchsten und beiderseits deutlich abgesetzt.

5. Diskussion

5.1. Nachweis des Inhibitors im Hühnerembryo:

Der Inhibitor im 12 Tage alten Hühnerembryo zeigt bei gleicher Konzentration und gleicher Enzymaktivität eine um 16% höhere Aktivität als der unter gleichen Bedingungen gewonnene Inhibitor der Rattenleber.

5.2. Proportionalität zwischen Hemmeffekt und Inhibitormenge

Für die Rattenleber konnte eine lineare Beziehung zwischen Inhibitor-Konzentration und Inhibitoraktivität bis zu 25% Inhibierung festgestellt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den von HENSTELL und FREEDMAN (31) erhaltenen überein. Für den Inhibitor des Hühnerembryos bleibt die Linearität bis zu 75% Inhibierung erhalten. Die Linearität liegt damit in der von ZALITE und ROTH (76) für die Rattenleber gefundenen Größenordnung.

5.3. Nachweis zweier Inhibitorfunktionen

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Inhibitor des Hühnerembryos mindestens aus zwei Fraktionen besteht. Davon fällt die eine in der Kühlzentrifuge (bei 14-16000xg + 7°C) aus. Die spezifisch leichtere Fraktion bildet in der Ultrazentrifuge bei 35000xg nochmals 3 Schichten von unterschiedlicher Aktivität. Pro 0,1 ml zeigte die mittlere Schicht die höchste Aktivität. Hieraus lässt sich schliessen, dass sich der Inhibitor in dieser mittleren Schicht am stärksten konzentriert. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass das Gesamtzentrifugat 3 Inhibitoren enthält. Die Klärung dieser Frage verlangt kompliziertere Verfahren (49, 48).

5.4. Abhängigkeit der Inhibitoraktivität von der Enzymaktivität:

Gleicher Prozentsatz an Inhibierung trotz steigender Enzymkonzentration wurde für den Ratteninhibitor festgestellt (76). Für den Hühnerembryoinhibitor wurde gefunden: Der

Prozentsatz an Inhibierung hängt ab von der von der DNase I-Reaktion durchlaufenen Extinktionsdifferenz. Gleichgültig ist hierbei, ob diese Extinktionsdifferenz von der geänderten Konzentration des Enzyms oder von der bereits abgelaufenen Reaktionszeit verursacht wird. Der Prozentsatz an Inhibitor-Aktivität sinkt dabei mit steigender Extinktionsdifferenz. Bei sehr hoher Enzymkonzentration war die Enzymreaktion in der Kontrolle bereits zu Beginn der Messung weitgehend abgelaufen. Am Ende der Messung ergaben sich deshalb Extinktionsdifferenzen zwischen erster und letzter Messung, die denen des weniger aktiven Enzyms entsprachen. In der Probe jedoch hatte zu Beginn der Messung die DNase I ihr Aktivitätsmaximum noch nicht überschritten. Die Probenkurve stieg linear an. Das Verhältnis der Probenwerte zu denen der Kontrollkurve war schon zu Beginn der Messung sehr eng und wurde im Verlauf der Messung immer enger. Die errechnete Inhibitor-Aktivität war deshalb zu Beginn der Messung schon sehr niedrig (27%) und sank im Verlauf der Reaktion noch weiter.
Aus dem Verlauf der Kontroll- und der Probenkurve lässt sich schliessen:

1. Der Inhibitor vermindert die Spaltungsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes. Dies geschieht nicht durch Anlagerung des Inhibitors an die aktive Gruppe des Enzyms (= nicht kompetitive Hemmung). Im Laufe der Reaktion gibt der Inhibitor für den Abbau der DNA Enzym frei. Er bedingt damit den linearen Anstieg der Probenkurve. Es handelt sich in diesem Fall um ein tatsächliches Sinken der Inhibitoraktivität.

2. Die Enzymaktivität erschöpft sich im Laufe der Kontrollreaktion, bzw. es wachsen die Abbauprodukte der DNA so stark an, dass sie die Enzymaktivität hemmen. Das ergibt der Verlauf der Kontrollkurve. Die Inhibitoraktivität sinkt in diesem Fall nur scheinbar.

3. Der Abfall der Inhibitoraktivität könnte auf eine durch äussere Einflüsse - während eines Reaktionsablaufes - bewirkte Inaktivierung des Inhibitors zurückzuführen sein. Da die Verminderung der Inhibitor-Aktivität nicht zeitabhängig ist, scheidet diese Annahme aus.

5.5. Zum Verhalten der Inhibitoraktivität bei Lagerung in der Kühltruhe:

1. Bei Lagerung der Inhibitoren sinkt die Aktivität (17, 24, 76). Das trifft auch für den Inhibitor des Hühnerembryos zu. Der Aktivitätsabfall tritt erst bei der Lagerung in der Kühltruhe auf. Er ist nicht bedingt durch den plötzlichen Temperaturwechsel beim Einfrieren und Wiederauftauen.

2. Die Aktivität des gelagerten Inhibitors vermindert sich während des Versuches bei steigender Enzymaktivität nicht so stark wie die Inhibitoraktivität des frisch gewonnenen Inhibitors. Daraus lässt sich folgern: Entweder sind bei der Reaktion des Enzyms mit der DNA 2 Aktivitätszentren an einem Inhibitor wirksam oder es liegen 2 Inhibitorfraktionen vor. Das eine Aktivitätszentrum (bzw. der eine Inhibitor) hängt stärker von der vom Enzym durchlaufenen Extinktionsdifferenz ab als das andere Aktivitätszentrum (bzw. die andere Inhibitorfraktion). Es bedingt den stärkeren Abfall der Inhibitoraktivität des frisch gewonnenen Inhibitors. Dieses Aktivitätszentrum (bzw. diese Inhibitorfraktion) ist kältelabil und wird in der Kühltruhe vernichtet. Es kommt damit nicht mehr zur Wirkung. Übrig bleibt das andere Aktivitätszentrum, dessen Aktivität während der Reaktion schwächer sinkt.
Für einen komplizierten Wirkungsmechanismus sprechen auch die Michaeliskonstanten. Bei Zugabe des Inhibitors erhöht sich die Michaeliskonstante, und die halbmaximale Geschwindigkeit sinkt.

Da sich V_{max} und K_m ändern, ist an den Typ der unkompetitiven Hemmung, d.h. der Reaktion des Inhibitors mit dem Enzym-Substrat-Komplex zu denken.

5.6. Zur anfänglichen Verzögerung der Enzymreaktion bei Zugabe des Inhibitors.

Die von LINDBERG (49) festgestellte anfängliche Verzögerung der DNase-Reaktion bei Zugabe des Inhibitors der Kälbermilz trifft auch für den Hühnerembryo-Inhibitor zu. Die anfängliche Verzögerung ist aber nur bei Enzymaktivitäten nachweisbar, die zwischen erster und letzter Messung keine grössere Extinktionsdifferenz als Δ E 0,65 haben. Es ist möglich, dass die Enzymreaktion verzögert beginnt. Jedoch kann diese Verzögerung im allgemeinen nicht mehr durch die erste Messung erfasst werden. Nach Zugabe des Inhibitors wird die anfängliche Verzögerung der Enzymreaktion verlängert.

5.7. Zu den chemisch-physikalischen Eigenschaften des Inhibitors:

Der Inhibitor im Hühnerembryo ist wie die in anderen Tieren festgestellten Inhibitoren thermolabil. Nach der Inaktivierung des Inhibitors durch Erhitzung konnte aber die von anderen Autoren berichtete Aktivierung der DNase nicht festgestellt werden (22, 23, 50, 76).

Der Inhibitor lässt sich durch SH-Gruppenblocker vollständig inaktivieren. Die Thermolabilität und die Sulfhydrylgruppe des Inhibitors lassen vermuten, dass es sich bei dem Inhibitor tatsächlich um ein Protein handelt.

5.8. Zum Verhalten des DNase I-Inhibitors im Hühnerembryo während der Ontogenese.

Über das Verhalten der DNA-Konzentration des Hühnerembryos während der Entwicklung liegen uneinheitliche Angaben vor (38, 56, 59, 63, 71, 72). Auf Frischgewicht

bezogen beobachtete KREUZER (38) nach einem Konzentrationsminimum um den 10.Bebrütungstag Konzentrationszuwachs zum 16.Tag hin. - Wird der Einbau von ^{32}P-Natriumphosphat in die Nucleinsäuren gemessen, dann ist der Nucleinsäureumsatz um den 13.Entwicklungstag des Hühnerembryos am höchsten (69). Gemessen am Einbau von Thymidin-^{14}C (27) oder Formiat-^{3}H (52) nimmt die Biosynthese der DNA des Hühnerembryos im Verlauf der Entwicklung expontentiell ab.
Die DNase I-Aktivität des Hühnerembryos bleibt - auf Frischgewicht bezogen - bis zum 12.Bebrütungstag annähernd konstant. Sie vervierfacht sich innerhalb der folgenden 4 Entwicklungstage (38, 71). Auf Frischgewicht bezogen zeigen somit Inhibitor und Enzym keine gesetzmässige Korrelation. Legt man indes die Proteinkonzentration als Bezugsbasis zugrunde, dann fällt immerhin auf, dass sich Enzym und Inhibitor etwa von der Entwicklungsmitte an praktisch umgekehrt proportional zueinander verhalten. Während beispielsweise die spezifische Inhibitoraktivität des KZ-Überstandes vom Embryohomogenat vom 7.Bebrütungstag an nahezu linear um mehr als die Hälfte des Ausgangswertes abnimmt, verdoppelt sich die spez. Aktivität der DNase I vom 10. zum 16.Tag ebenfalls praktisch linear (38, 71). Die spezifischen Aktivitäten von Enzym und Inhibitor betragen so beispielsweise am 13.Tag 137,6 bzw. 81,8 und am 15.Tag 178,7 bzw. 58,2%. Daraus könnte der Schluss gezogen werden, dass sich die spezifische Aktivität der DNase I zumindest teilweise als Ausdruck des Abfalls ihres Inhibitors erhöht.
In der A l l a n t o i s f l ü s s i g k e i t war eine DNase I-Inhibitoraktivität nicht immer mit Sicherheitn nachzuweisen. DarÜberhinaus ist nicht auszuschliessen, dass diese Hemmaktivität den Spuren von Blutbeimengungen entstammt, die gelegentlich der Entnahme mit in die Allantoisflüssigkeit übergehen. Trifft dies zu, so wird

kein oder ein mit dieser Methode nicht mehr nachweisbarer Inhibitoranteil aus dem Embryo in die Allantoisflüssigkeit ausgeschieden.

5.9. Zur Verteilung des Inhibitors in den Organen.
Die Inhibitoraktivität war - bezogen auf die Gewichtseinheit Frischgewicht - in der Milz am höchsten, im Herzen am geringsten. Diente die Proteinkonzentration als Bezugsbasis, zeigten Herz und Magen/Darmtrakt die höchste und die Leber die niedrigste Hemmaktivität. Diese Ergebnisse stimmen mit den von LINDBERG für das Kalb gefundenen Werten überein (49).

6. Zusammenfassung:

Am 12 Tage alten Hühnerembryo wurden Nachweisbarkeit, einige Eigenschaften und Ontogenese eines DNase I-Inhibitors untersucht. Die wesentlichsten Ergebnisse lassen sich, wie folgt, zusammenfassen:

1. Der DNase I-Inhibitor ist unter ähnlichen Bedingungen wie der DNase I-Inhibitor der Rattenleber nachweisbar.
2. Der Inhibitor ist thermolabil. Er verliert auch bei Lagerung bei -15°C fortlaufend an Aktivität.
3. Der Inhibitor ist durch SH-Gruppenblocker in einer Endkonzentration in der Größenordnung von 10^{-5} M vollständig zu inaktivieren.
4. Etwa 6% der Inhibitoraktivität von Embryohomogenat sind zusammen mit der Mitochondrienfraktion durch Zentrifugation bei 14000 - 16000 xg zu sedimentieren.
5. Zur Wirkungsweise des Inhibitors gilt:
   a) Der Abbau von DNA an DNase I beginnt in Gegenwart des Inhibitors verzögert.
   b) Die relative Inhibitoraktivität ist am größten, sobald der DNA-Abbau der ungehemmten Kontrollreaktion Extinktionsdifferenzen um 0,23 durchläuft. Die relative Inhibitoraktivität verringert sich bei Extinktionsdifferenzen (ΔE) von 0,23 - 0,6 der Kontrollreaktion in linearer Abhängigkeit von ΔE.
   c) Unter den Bedingungen des Versuchs war die Inhibitoraktivität der Leber bei DNase I-Hemmung $< 25\%$, jene vom Hühnerembryo bei DNase I-Hemmung $< 70\%$ der Inhibitorkonzentration direkt proportional.
   d) Gemessen an der DNA-Abbaurate bei Substratsättigung wird die DNase I durch den Inhibitor des Hühnerembryos nicht kompetitiv gehemmt.

c) Als Michaeliskonstanten für die gehemmte bzw. ungehemmte DNase I-Reaktion wurden Werte von 2,525 bzw. 1,965 . 10^{-7} Mol/Liter errechnet.

6. Zum Verhalten des DNase I-Inhibitors während der Ontogenese gilt:

a) Bezogen auf die Gewichtseinheit Frischgewicht erhöht sich die Inhibitoraktivität um knapp 2o% zwischen dem 5. und 7. Entwicklungstag und vermindert sich am 9.Tag wieder auf den um den 5.Tag ermittelten Wert. Nach erneuter Erhöhung auf den am 7.Tag gemessenen Wert um die Entwicklungsmitte folgt weitgehende Aktivitätskonstanz auf dem erreichten Niveau.

b) Die spez. Inhibitoraktivität durchläuft um den 7.Entwicklungstag des Hühnerembryos ein beiderseits deutlich abgesetztes Maximun.

7. In den untersuchten Organen des 17 Tage alten Hühnerembryos fiel die DNase I-Inhibitoraktivität -bezogen auf die Gewichtseinheit Frischgewicht - in der Reihenfolge Milz ≫ Magen/Darm > Leber/Galle > Herz, - bezogen auf die Proteinkonzentration - in der Reihenfolge Herz ≈ Magen/Darm ≫ Milz > Leber/Galle ab.

8. In der Allantoisflüssigkeit war der DNase I-Inhibitor nicht immer mit Sicherheit nachweisbar.

9. Aus der Gegenüberstellung der spezifischen Aktivitäten von DNase I und DNase I-Inhibitor während der Ontogenese folgt, dass der Aktivitätsanstieg der DNase I während der 2.Hälfte der Entwicklung zumindest teilweise durch Abfall der Inhibitoraktivität erklärt werden kann.

Literaturverzeichnis

1. ADAMS, R.L.:
Periodic activation of lysosomal enzymes during regeneration of the liver.
Biochem. J. 87, 532 (1963)

2. AEBI, H.:
Kinetik,
p. 159 in: Biochemisches Taschenbuch,
Hrsg. von H.M. RAUEN, 2.Teil,
Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York: Springer 1964

3. ALLFREY, V., and A.E. MIRSKY:
Some aspects of the deoxyribonuclease activities of animal tissues.
J. gen. Physiol. 36, 227 (1952/53)

4. BAUMGARTEN, W., R.F. JOHNSON, R.F. FINGER and F.E. PAGENKEMPER:
The isolation and purification of pancreatic deoxyribonuclease.
Arch. Biochem. Biophys. 77, 206 (1958)

5. BEAUFAY, H., D.S. BENDALL, P. BAUDHUIN and C. DEDUVE:
Tissue fractionation studies.
Biochem. J. 73, 623 (1959)

6. BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, T. BÜCHER, R. CZOK, K.H. GARBADE, E. MEYER-AHRENDT und G. PFLEIDERER:
Diphosphofructose - Aldolase, Phosphoglyceraldehyd - Dehydrogenase, Milchsäure - Dehydrogenase, Glycerophosphat - Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforsch. 8b, 555 (1957)

7. BERGER, G., et P. MAY:
Etude d'un inhibiteur de la désoxyribonucléase neutre présent dans le sérum de rat.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 258, 1093 (1964)

8. BERNARDI, G., E. APELLA and R. ZITRO:
Studies on acid deoxyribonuclease.
III. Physical and chemical properties of spleen acid deoxyribonuclease.
Biochemistry 4, 1725 (1965)

9. BERNHEIMER, A.W.:
Differentiation of ribonucleic acid by inhibition of streptococcal deoxyribonuclease.
Biochem. J. 53, 53 (1953)

10. BLUMENTHAL, G.:
A comparative study of the deoxyribonuclease activity in adult and embryonic tissue.
J. Embryol. exp. Morph. 5, 377 (1957)

11. BRODY, S.:
Studies on ribonuclease and desoxyribonuclease activities in homogenates from human placenta.
Acta chem. Scand. (Copenh.) 7, 721 (1953)

12. BRODY, S.:
Deoxyribonuclease activity and deoxyribonucleic acid synthesis in normal, regenerating, precancerous and cancerous rat liver.
Nature (Lond.) 182, 1386 (1958)

13. CATCHSIDE, D.G., and B. HOLMES:
The action of enzymes on chromosomes.
Symp. Soc. exp. Biol. 1, 225 (1947)

14. COOPER, E.J., M.L. TRAUTMAN and M. LASKOWSKI:
Occurence and distribution of an inhibitor for desoxyribonuclease in animal tissue.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 73, 219 (1950)

15. CORDONNIER, C., and G. BERNARDI:
Distribution of acid deoxyribonuclease in different tissues and species.
Biochem. J. 94, 12P (1965)

16. CRUZ-COKE, E., M. PLAZA DE LOS REYES and J. MARTENS:
Zitiert bei 44.
Soc. Biol. Santiago de Chile, 9, 38 (1951)

17. DABROWSKA, W., E.J. COOPER and M. LASKOWSKI:
A specific inhibitor for desoxyribonuclease.
J. biol. Chem. 177, 991 (1949)

18. DAVIS, B.J.:
Zitiert bei 44.
Am. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964)

19. DEISENHOFER, R.:
Über die Desoxyribonuclease II des Hühnerembryos.
Diss. med. vet., München, in Vorbereitung

2o. DESREUX, V., R. HACHA and E.FRÉDÉRICQ:
Activation of deoxyribonucleases by divalent cations.
J. gen. Physiol. 45, 93 (1962)

21. DOCTOR, V.M.:
Inhibition of deoxyribonuclease I of human serum in vitro by nitrogen mustard or leucocyte extracts.
Arch. Biochem. 96, 475 (1962)

22. FEINSTEIN, R.N.:
Activation of the neutral deoxyribonuclease.
J. biol. Chem. 235, 733 (196o)

23. FEINSTEIN, R.N., and F.O. GREEN:
An activator of deoxyribonuclease in rat plasma.
Arch. Biochem. Biophys. 6o, 5o2 (1956)

24. FEINSTEIN, R. N., and U. HAGEN:
Stabilization and augmentation of the neutral deoxyribonuclease in mammalian tissues.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 55, 56 (1962)

25. FESTY, B., et C. PAOLETTI:
Mise en évidence et propriétés d'un (ou plusieurs) inhibiteur(s) naturel(s) de la déoxyribonucléase neutre pancréatique.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 257, 3682 (1963)

26. FISCHER, F.G., J. BÖTTGER und H. LEHMANN-ECHTERNACHT:
Über die Thymo-polynucleotidase aus Pankreas.
Nucleinsäuren V.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 271, 246 (1941)

27. FRIEDKIN, M., D.TILSON and D.ROBERTS:
Studies of deoxyribonucleic acid biosynthesis in embryonic tissue with thymidine-^{14}C.
J. biol. Chem. 22o, 627 (1956)

28. GREENE, L.J., C.H. W. HIRS and G.E. PALADE:
On the protein composition of bovine pancreatic zymogen granules.
J.biol.Chem. 238, 2o54 (1963)

29. GUPTA, S., and R.M.HERRIOTT:
Nucleases and their inhibitors in the cellular components of human blood.
Arch. Biochem. Biophys. 1o1, 88 (1963)

30. HENSTELL, H.H., and R.I. FREEDMANN:
The viscosimetric determination of desoxyribonuclease inhibition.
Cancer Res. 12, 341 (1952)

31. HENSTELL, H.H., R.I. FREEDMAN and B. GINSBURG:
An inhibitor of desoxyribonuclease in human white blood and bone marrow cells, and its relationship to cellular maturity.
Cancer Res. 12, 341 (1952)

32. KARLSON, D.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
4. Aufl., Stuttgart, Thieme 1964

33. KELLER, D.J., E. COHEN and H.NEURATH:
The proteins of bovine pancreatic juice.
J. biol. Chem. 233, 344 (1958)

34. KEIR, H.M., R.M.S. SMELLIE and G. SIEBERT:
Intracellular location of DNA nucleotidyltransferase.
Nature (Lond.) 196, 752 (1962)

35. KIEFER, G., R. KIEFER, G. ZAHN und R.K. ZAHN:
Über Desoxyribonucleinsäuren und Desoxyribonucleasen.
Der Einfluss von DNS und Nukleotiden auf die DNase-Wirkung am Seeigelei.
Biochem Z. 334, 49 (1961)

36. KIEFER, G., und R.K. ZAHN:
Wirkung von DNasen auf die intakte Zelle.
Naturwissenschaften 48, 581 (1961)

37. KOVACS, E.:
Comparative biochemical studies on normal and on poliomyelitis virus infected tissue cultures.
VIII. Inhibition of desoxyribonucleases of Rhesus Kidney cells.
Z. Naturforsch. 13 b, 34 (1958)

38. KREUZER, H.:
Über die Desoxyribonuclease I des Hühnerembryos.
Diss. med. vet., München,1966

39. KUNITZ, M.:
Crystalline desoxyribonuclease.
I. Isolation and general properties.
Spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity.
J. gen. Physiol. 33, 349 (1950)

40. KUNITZ, M.:
Crystalline desoxyribonuclease.
II. Digestion of thymus nucleic acid (desoxyribonucleic acid).
The Kinetics of the reation.
J. gen. Physiol. 33, 363 (1950)

41. KUNITZ, M.:
Isolation of crystalline desoxyribonuclease from beef pancreas,
Science 108, 19 (1948)

42. KURNICK, N.B.:
Determination of deoxyribonuclease activity.
Meth. Biochem. Anal. 9, 1 (1962)

43. KURNICK, N.B., L.I. SCHWARTZ, S. PARISER and S.W. LEE:
A specific inhibitor for human desoxyribonuclease and an inhibitor of the lupus erythematous cell phenomen from leucocytes.
J. clin. Invest. 32, 193 (1953)

44. LASKOWSKI, M.:
Desoxyribonucleases,
p. 123 in: The enzymes, ed. by P.D. BOYER, H. LARDY and K. MYRBÄCK,
2nd. edit., New York and London:
Acad. Press 1961

45. LASKOWSKI, M.:
Studies on thymonucleodepolymerase.
Arch. Biochem. 11, 41 (1946)

46. LASKOWSKI, M., and M.K. SEIDEL:
Zitiert bei 67.
Arch. Biochem. 7, 465 (1945)

47. LEHMANN, J.R., G.G. ROUSSOS and A.E. PRATT:
The deoxyribonuclease of Escherichia coli.
J. biol. Chem. 237, 819 (1962)

48. LINDBERG, U.:
Crystallization from calf spleen of two inhibitors of deoxyribonuclease I.
J. biol. Chem. 241, 1246 (1966)

49. LINDBERG, U.:
Purification of an inhibitor of pancreatic deoxyribonuclease from calf spleen.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 82, 237 (1964)

50. LOISELLE, J.M.,and R. CARRIER:
Cytoplasmatic inhibitor of deoxyribonuclease I
from rat liver tissue.
Canad. J. Biochem. Physiol. 41, 2423 (1963)

51. LUMPER, L.:
Grundlagen der Kinetik enzymatisch katalysierter
Reaktionen.
p. 17 in: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-
chemischen Analyse,
Hrsg. von HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, 10.Aufl., 6.Band,
Teil A, Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York,
Springer 1964

52. MARRIAN, D.H., A.F. HUGHES and S.M. WERBA:
Nucleic acid metabolism of the developing chick embryo.
Biochim.biophys. Acta (Amst.) 19, 318 (1956)

53. MAVER, M.E., and A.E. GRECO:
The nuclease activities of cathepsin preparations from
calf spleen and thymus.
J. biol. Chem. 181, 861 (1949)

54. McCARTY , M.:
Purification and properties of desoxyribonuclease isolated
from beef pancreas.
J. gen. Physiol. 29, 123 (1945)

55. McCARTY , M., and O.T. AVERY:
Studies on the chemical nature of the substance inducing
transformation of pneumococcal types.
J. exp. Med. 83, 97 (1946)

56. MINELLI, G., e M.R. ROSSI:
Il comportamento degli acidi nucleinici durante lo
sviluppo di gallus (razza livornese bianca).
Ric. sci. 29, 1700 (1959)

57. MIYAII, T., and J.P. GREENSTEIN:
Cation activation of desoxyribonuclease.
Arch. Biochem. Biophys. 32, 414 (1951)

58. NETTER, H.:
Verschiedene Typen der Fermenthemmung,
p. 583 in: Theoretische Biochemie.
Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1959

59. NOVIKOFF, A.B., and V.R. POTTER:
Changes in nucleic acid concentration during the development
of the chick embryo.
J. biol. Chem. 173, 233 (1948)

60. ORNSTEIN, L.:
Zitiert bei 67
Am. N.Y. Acad. Sci. 121, 321 (1964)

61. PRIVAT DE GARILHE, M.:
p. 150 in: Les nucléases - application à l' étude des acides nucléiques,
aus der Reihe: Chimie des substances naturelles,
Paris: Herman 1964

62. PRIVAT DE GARILHE, M., and M.LASKOWSKI:
Study of the enzymatic degradation of deoxyribonucleic acid by two different deoxyribonucleodepolymerases.
J. biol. Chem. 215, 269 (1955)

63. REDDY, D.V.N., M.E. LOMBARDO and L.R. CERECEDO:
Nucleic acid changes during the development of the chick embryo.
J. biol. Chem. 198, 267 (1952)

64. ROVENSKII, Yu.A.:
The biological role of nucleases in normal and tumorous growth.
Usp. sovrem.biol. 59, 354 (1965)

65. SARKAR, N.K.:
The priming activities of deoxyribonuclease-treated deoxyribonucleic acid in two enzyme systems for deoxyribonucleic acid synthesis in vitro.
Arch. Biochem. Biophys. 93, 328 (1961)

66. SARKAR, N.K., M.A. MUKUNDAN and A. DEVI:
Role of deoxyribonuclease in synthesis of deoxyribonucleic acid.
Nature (Lond.) 200, 1205 (1963)

67. SIEBERT, G.:
Desoxyribonucleasen,
p. 1061 in: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse,
Hrsg. von HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, 10.Aufl., 6.Band, Teil B, Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1966

68. SIEBERT, G., K. LANG, S. LUCIUS-LANG, L.HERKERT, G. STARK , G. ROSSMÜLLER und H.JÖCKEL:
Eigenschaften und biologische Bedeutung der Desoxyribonuclease aus Säugetierorganen.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 295, 229 (1963)

69. STEVENS, K.M.:
Relation of uptake of radiophosphorus into nucleic acids to age of developing chick embryos.
Cancer Res. 12, 62 (1952)

7o. TEMPEL, K., und K. ZIPF:
Über Desoxyribonucleasen des Hühnerembryos.
Berl.Münchn.tierärztl.Wschr. 79, 28 (1966)

71. TEMPEL, K., und K. ZIPF:
Die Desoxyribonucleasen I und II des Hühnerembryos während der Ontogenese.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 344, 34 (1966)

72. WANG, T.Y., K.M. HSIEH and H.T. BLUMENTHAL:
The effect of growth hormone on the nucleic acid content of the developing chicken embryo.
Endocrinol. 53, 52o (1953)

73. WIBERG, J.S.:
On the mechanism of metal activation of deoxyribonuclease I.
Arch. Biochem.Biophys. 73, 337 (1958)

74. ZAHN, R.K.:
DNases as growth substances.
Biochem.J. 76, 66P (196o)

75. ZAHN, R.K., H.K. MÜLLER, S.MÜLLER und G. ZAHN:
Eine biologische Wirkung von Desoxyribonuclease auf die befruchteten Eier von Arbacia pustulosa (lixula).
Biochem.Z. 331, 518 (1959)

76. ZALITE, B.R., and J.S. ROTH:
An assay for and some properties of deoxyribonuclease inhibitor in rat liver.
Arch. Biochem. Biophys. 1o7, 16 (1964)

77. ZAMENHOF, S., and E. CHARGAFF:
Desoxyribonuclease in yeast and specific nature of its cellular regulation.
Science 1o8, 628 (1948)

78. ZAMENHOF, S., and E.CHARGAFF:
Studies on the desoxypentose nuclease of yeast and its specific cellular regulation.
J. biol. Chem. 18o, 727 (1949)

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. K. Z i p f
danke ich für die Überlassung des Themas
und die Anteilnahme am Gelingen der Arbeit.

Dank sage ich auch Herrn Dr. K. T e m p e l
für Rat und Anleitung.

L E B E N S L A U F

Am 3. Februar 194o wurde ich als zweite Tochter des Chemikers Dr. Ludwig Schneider und seiner Ehefrau Susi, geborene Scharfe, in Berlin geboren. Von 1946 bis 196o besuchte ich in Starnberg am See die Volksschule und das Realgymnasium. Nach dem Abitur studierte ich an der Universität München 9 Semester Tiermedizin. Im Juli 1965 beendete ich das veterinärmedizinische Staatsexamen. Nach einer halbjährigen Praktikantenzeit in der Gynäkologischen Tierklinik und im Schlachthof in München erhielt ich am 1. April 1966 die Bestallung als Tierärztin.

DISSERTATIONS – DRUCK · BLASADITSCH · AUGSBURG